

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ALEX EVANGELISTA DO AMARAL**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPLEXOS POLISSACARÍDEOS-  
OXOVANÁDIO (IV/V) SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE  
CAMUNDONGOS E *Leishmania in vitro***

**CURITIBA**

**2011**

**ALEX EVANGELISTA DO AMARAL**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPLEXOS POLISSACARÍDEOS-  
OXOVANÁDIO (IV/V) SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE  
CAMUNDONGOS E *Leishmania in vitro***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências-Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Guilhermina  
Rodrigues Noletto**

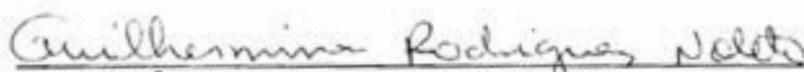
**CURITIBA**

**2011**

## TERMO DE APROVAÇÃO


AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPLEXOS DE POLISSACARÍDEOS-  
OXOVANÁDIO(IV/V) SOBRE MACRÓFOS PERITONEAIS DE  
CAMUNDONGOS E LEISHMANIA *in vitro*

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência- Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Profa. Dr.ª. Guilhermina Rodrigues Noletto

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Setor de Ciências Biológicas  
UFPR



Profa. Dr.ª. Silvia Maria Suter Correia Cadena

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Setor de Ciências Biológicas  
UFPR



Profa. Dr.ª. Silvia Amaral Gonçalves da Silva

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – Faculdade de  
Ciências Médicas  
UERJ

Curitiba, 14 de fevereiro de 2011.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar meu caminho.

À minha família, Jair, Nair, Erick e Eliane, Andressa, Jamal e Jamal Victor, Ari, Salete e Lucas, pelo carinho, apoio e por tornar possível a realização dessa etapa em minha vida.

À Daniela por ser sempre presente, em cada momento. Obrigado por estar comigo, por dividir sua vida com a minha, com amor. Essa vitória só foi possível por você.

À minha orientadora, Professora Guilhermina, pela orientação, por me ensinar em como pensar, por me ajudar a superar dificuldades e me aproximar de Deus. Obrigado pelos esforços e por acreditar em mim.

À Monica pelas ótimas idéias quanto aos experimentos de infecção e preparo de ágar sangue. Principalmente por ter me mostrado que é possível continuar.

À Marianna pelos experimentos de citocinas, pelas palavras, por tornar o ambiente positivo e por poder sempre contar contigo.

Ao Arquimedes, Doumit e Glaucio por construirmos um quarto, por dividirem o apartamento, conversas, idéias, apoio e pelo exemplo de determinação.

Ao Fagner, do Departamento de Patologia, por cada uma das coletas de sangue realizadas.

À Juliana Amorim por me acompanhar em diversos experimentos, sempre se dedicando ao máximo e não importando os horários.

Ao Hudson pelas noites de estudos e de experimentos, e pelo empenho na manutenção do laboratório.

Ao Thiago e a Juliana por não medirem esforços para a realização do “western blotting”. Muitas emoções!

À Vivian por revelar o “western blotting” em filme de raio-x, mostrando novos caminhos para a realização dessa técnica.

Aos Professores Elaine Carbonero, Miguel, Maria Eugênia e Silvia Cadena, assim como os amigos e colegas de laboratório, pelas palavras quando quis desistir do mestrado.

Aos amigos e colegas de laboratório, Amanda, Andréia, Anna, Beth, Carina, Carol Lane, Carol Valente, Cláudio, Fernanda, Fran, Gisele, Glaucio, Gustavo,

Helyn, Hudson, Izabela, Juliana A., Juliana K., Juliana S., Patrícia, Paulo, Regina, Thiago, pela convivência ímpar. Por todo apoio quando precisei.

À Professora Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz por ceder os polissacarídeos GALMAN-A e GALMAN-B, XGJ, e ao Professor Marcello Iacomini por ceder os polissacarídeos ARAGAL e GMPOLY.

À Professora Ana Lucia Ramalho Mercê (Departamento de Química – UFPR) pela complexação dos polissacarídeos com vanádio.

À Professora Vanete Soccol (Departamento de Patologia – UFPR) pela doação da estirpe de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

À Professora Nadja Souza (Instituto de Química – USP) pela doação de parte dos camundongos.

À Deise Regina Sprada Pontarolli (Centro de Medicamentos do Paraná – SESA) pela doação do Glucantime®.

À Doutoranda Lucia (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR) pela realização das dosagens de carboidratos totais.

À todos os funcionários do biotério do Setor de Ciências Biológicas, principalmente Isellen e Ana, pela dedicação e trabalho prestados.

Aos Professores do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, Eva Carnieri, Gláucia Martinez, Maria Eliane, Sheila Winnischofer e Silvia Cadena.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica.

À CAPES, CNPq, PRONEX-Carboidratos e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1 <i>Leishmania</i> spp. ....	16
2.1.1 Leishmanioses .....	17
2.1.1.1 Tratamento das leishmanioses.....	23
2.2 MACRÓFAGOS .....	27
2.2.1 Óxido nítrico e citocinas produzidas por macrófagos .....	29
2.3 IMUNOMODULADORES .....	36
<b>3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>41</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
5.1 MATERIAL E REAGENTES .....	42
5.2 POLISSACARÍDEOS COMPLEXADOS COM OXOVANÁDIO .....	42
5.3 SOLUÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS E SEUS COMPLEXOS .....	43
5.3.1 Dosagem de carboidratos totais.....	44
5.4 PROCEDIMENTOS DE CULTIVO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS .....	45
5.4.1 Meio MEM .....	45
5.4.2 Meio Tobbie & Evans .....	45
5.4.3 Cultura de células e procedimentos experimentais relacionados.....	46
5.4.3.1 Obtenção de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos.....	46
5.4.3.2 <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	47
5.4.3.3 Determinação da viabilidade celular utilizando MTT .....	47
5.4.3.4 Avaliação do efeito dos compostos na produção de óxido nítrico. ....	49
5.4.3.5 Avaliação do efeito dos compostos sobre a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-10 .....	50

5.4.3.6 Avaliação da atividade leishmanicida sobre a forma amastigota intracelular em macrófagos.....	52
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
6.1 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS E SEUS COMPLEXOS COM OXOVANÁDIO (IV/V) EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS ...	55
6.1.1 Efeitos sobre a viabilidade celular .....	55
6.1.2 Efeitos dos complexos ARAGAL:VO, GMPOLY:VO e XGJ:VO sobre a produção de óxido nítrico .....	58
6.1.3 Efeitos dos polissacarídeos e seus complexos sobre a produção de interleucina-1 $\beta$ .....	60
6.1.4 Efeitos dos polissacarídeos e seus complexos sobre a produção de interleucina-6.....	64
6.1.5 Efeitos dos polissacarídeos e seus complexos sobre a produção de TNF- $\alpha$ ...	68
6.1.6 Efeitos dos polissacarídeos e seus complexos sobre a produção de interleucina-10.....	71
6.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS POLISSACARÍDEOS E SEUS COMPLEXOS SOBRE A FORMA AMASTIGOTA INTRACELULAR DE <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	73
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....</b>	<b>96</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	CICLO DE VIDA DE <i>Leishmania</i> spp.....	17
FIGURA 2 -	LEISHMANIOSES EM HUMANOS.....	19
FIGURA 3 -	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	20
FIGURA 4	CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL.....	22
FIGURA 5 -	TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE.....	24
FIGURA 6 -	HETEROGENEIDADE DE MONÓCITOS .....	28
FIGURA 7 -	REPRESENTAÇÃO DA HETEROGENEIDADE DE MACRÓFAGOS DURANTE INFLAMAÇÃO.....	29
FIGURA 8 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DE GENES PARA A iNOS.....	31
FIGURA 9 -	ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS DA iNOS HUMANA.....	32
FIGURA 10 -	SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO CATALISADA POR iNOS.....	33
FIGURA 11 -	SINALIZAÇÃO E REGULAÇÃO DE IL-6.....	35
FIGURA 12 -	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	41
FIGURA 13	OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS.....	47
FIGURA 14	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO MTT	48
FIGURA 15 -	REAÇÃO DE NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> COM O REAGENTE DE GRIESS.....	49
FIGURA 16	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	50
FIGURA 17	ELISA DE CAPTURA.....	51
FIGURA 18	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-10.....	52
FIGURA 19	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA SOBRE A FORMA AMASTIGOTA INTRACELULAR EM MACRÓFAGOS.....	53
FIGURA 20 -	VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ARAGAL:VO, GMPOLY:VO, E XGJ:VO POR 48 HORAS.....	57



FIGURA 21 - PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ARAGAL:VO, GMPOLY:VO E XGJ:VO POR 48 HORAS.....	59
FIGURA 22 - PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-1 $\beta$ POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ARAGAL, ARAGAL:VO, GMPOLY, GMPOLY:VO, XGJ E XGJ:VO POR 48 HORAS.....	61
FIGURA 23 - PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-1 $\beta$ POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM GALMAN-A, GALMAN-A:VO, GALMAN-B E GALMAN-B:VO POR 48 HORAS.....	63
FIGURA 24 - PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-6 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ARAGAL, ARAGAL:VO, GMPOLY, GMPOLY:VO, XGJ E XGJ:VO POR 48 HORAS.....	66
FIGURA 25 - PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-6 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM GALMAN-A, GALMAN-A:VO, GALMAN-B E GALMAN-B:VO POR 48 HORAS.....	67
FIGURA 26 - PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ARAGAL, ARAGAL:VO, GMPOLY, GMPOLY:VO, XGJ E XGJ:VO POR 48 HORAS.....	69
FIGURA 27 - PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM GALMAN-A, GALMAN-B, GALMAN-A:VO E GALMAN-B:VO POR 48 HORAS.....	70
FIGURA 28 - PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-10 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ARAGAL, ARAGAL:VO, GMPOLY, GMPOLY:VO, XGJ E XGJ:VO POR 48 HORAS.....	72
FIGURA 29 - PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-10 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM GALMAN-A, GALMAN-B, GALMAN-A:VO E GALMAN-B:VO POR 48 HORAS.....	73
FIGURA 30 - ATIVIDADE LEISHMANICIDA SOBRE A FORMA AMASTIGOTA POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ARAGAL E ARAGAL:VO POR 48 HORAS.....	75

FIGURA 31 - ATIVIDADE LEISHMANICIDA SOBRE A FORMA AMASTIGOTA POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM GMPOLY E GMPOLY:VO POR 48 HORAS.....	76
FIGURA 32 - ATIVIDADE LEISHMANICIDA SOBRE A FORMA AMASTIGOTA POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM XGJ E XGJ:VO POR 48 HORAS.....	77
FIGURA 33 - ATIVIDADE LEISHMANICIDA SOBRE A FORMA AMASTIGOTA POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM GALMAN-A, GALMAN-A:VO, GALMAN-B E GALMAN-B:VO POR 48 HORAS.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARAGAL	Arabinogalactana isolada de <i>Anadenanthera colubrina</i> (angico branco)
ARAGAL:VO	Arabinogalactana de <i>Anadenanthera colubrina</i> (angico branco) complexada com oxovanádio (IV/V)
BRM	Modificadores da resposta biológica
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CL	Leishmaniose cutânea
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DCL	Leishmaniose cutânea difusa
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio de enzima ligada ao imunoabsorvente
GALMAN-A	Galactomanana-A de <i>Mimosa scabrella</i> (bracatinga)
GALMAN-A:VO	Galactomanana-A de <i>Mimosa scabrella</i> (bracatinga) complexada com oxovanádio (IV/V)
GALMAN-B	Galactomanana-B de <i>Mimosa scabrella</i> (bracatinga)
GALMAN-B:VO	Galactomanana-B de <i>Mimosa scabrella</i> (bracatinga) complexada com oxovanádio (IV/V)
GMPLY	Galactomanana de <i>Ramalina celastri</i> (liquem)
GMPLY:VO	Galactomana de <i>Ramalina celastri</i> (liquem) complexada com oxovanádio (IV/V)
IL-1	Interleucina-um
IL-10	Interleucina-dez
IL-1 $\beta$	Interleucina-um beta
IL-6	Interleucina-seis
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KOH	Hidróxido de potássio
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LPS	Lipopolissacarídeo
MCL	Leishmaniose mucocutânea
MEM	Meio mínimo essencial

MTT	Brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
NED	N-naftil-etilenodiamina
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associado à patógenos
PBS	Solução salina tamponada
PKDL	Leshmaniose dérmica pós-kala-azar
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TGF-β	Fator de transformação do crescimento-beta
TLR4	Receptor “Toll-like” quatro
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
VL	Leishmaniose visceral
XGJ	Xiloglucana de <i>Hymenaea courbaril</i> (jatobá)
XGJ:VO	Xiloglucana de <i>Hymenaea courbaril</i> (jatobá) complexada com oxovanádio (IV/V)

## RESUMO

Os polissacarídeos arabinogalactana (ARAGAL) de *A. colubrina* (angico branco), galactomanana (GMPOLY) do líquen *R. celastri*, duas preparações de galactomananas (GALMAN-A e GALMAN-B) de sementes de *M. scabrella* (bracatinga), xiloglucana obtida de sementes de *H. courbaril* (jatobá) e os complexos destes polímeros com oxovanádio (IV/V) nomeados (ARAGAL:VO, GMPOLY:VO, GALMAN-A:VO e GALMAN-B:VO, XGJ:VO) foram avaliados *in vitro* quanto a citotoxicidade, a ativação de macrófagos para a produção de óxido nítrico e interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) e atividade leishmanicida. Os complexos afetaram de forma significativa a viabilidade celular. ARAGAL:VO foi altamente tóxico, promovendo ~98% de perda de viabilidade celular com 100  $\mu$ g/mL. Os complexos ARAGAL:VO, GMPOLY:VO e XGJ:VO não alteraram a produção de óxido nítrico. ARAGAL e ARAGAL:VO, ambos na concentração de 10  $\mu$ g/mL aumentaram os níveis de IL-1 $\beta$  em ~360% e ~560%, respectivamente. GMPOLY e GMPOLY:VO na concentração de 25  $\mu$ g/mL promoveram um aumento nos níveis desta interleucina de ~660% e ~1050%, respectivamente, enquanto que XGJ e XGJ:VO promoveram estímulo equivalente de ~500% na concentração de 25  $\mu$ g/mL. GALMAN-B promoveu um aumento de aproximadamente 2 vezes na produção de IL-1 $\beta$ , quando comparado com GALMAN-A na mesma concentração (25  $\mu$ g/mL), enquanto que os níveis de IL-1 $\beta$  produzidas por macrófagos após o tratamento com as preparações de galactomananas (GALMAN-A e -B) complexadas com oxovanádio (IV/V) foram equivalentes variando de ~450% a ~630% na concentração de 25  $\mu$ g/mL. Para a IL-6 também foram observadas diferenças de efeitos para os tratamentos. As formas complexadas ARAGAL:VO (10  $\mu$ g/mL) e GMPOLY:VO (25  $\mu$ g/mL) promoveram um aumento de duas vezes nos níveis de IL-6 alcançando ~540% e ~790%, respectivamente, quando comparado com as mesmas concentrações das formas livres. XGJ e XGJ:VO, ambos na concentração de 25  $\mu$ g/mL promoveram um aumento nos níveis de IL-6 de ~200%. GALMAN-A e -B apresentaram perfis diferentes quanto aos níveis de IL-6. Somente GALMAN-B promoveu um aumento nos níveis desta interleucina de ~490% na concentração de 25  $\mu$ g/mL. As formas complexadas na mesma concentração aumentaram os níveis de IL-6 de ~450% e ~630% para GALMAN-A:VO e GALMAN-B:VO, respectivamente. Somente GALMAN-B e GALMAN-B:VO aumentaram a produção de IL-10 de forma equivalente em ~390% na concentração de 25  $\mu$ g/mL. Nenhum dos polímeros assim como seus complexos alterou a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais. Todos os polissacarídeos e seus complexos com oxovanádio exibiram efeito leishmanicida contra as formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. A intensidade de efeito foi similar ao observado para o Glucantime<sup>®</sup> que promoveu uma inibição de ~60% na concentração de 300  $\mu$ g/mL do antimonial. Os polissacarídeos e seus complexos com oxovanádio (IV/V) avaliados neste trabalho promoveram ativação de vias em macrófagos que podem estar diretamente envolvidas no intenso efeito leishmanicida, também evidenciado neste estudo.

Palavras chaves: Macrófago, *Leishmania (L.) amazonensis*, polissacarídeos, oxovanádio.

## ABSTRACT

The polysaccharides arabinogalactan (ARAGAL) from *A. colubrina* (angico branco), galactomannan (GMPOLY) of the lichen *R. celastri*, two galactomannans preparations (GALMAN-A and -B) of seeds of *M. scabrella* (bracatinga), Xyloglucans obtained from seed of *H. courbaril* (jatobá) and the complexes of these polymers with oxovanadium (IV/V) named (ARAGAL:VO GMPOLY:VO GALMAN-A:VO, GALMAN-B:VO e XGJ:VO) were evaluated for cytotoxicity, macrophages activation to nitric oxide and interleukins (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$ ) production and leishmanicidal activity. The complexes of polysaccharides with oxovanadium affect cell viability of macrophages. ARAGAL:VO was the most cytotoxic for these cells, providing by ~ 98% loss of cell viability at 100  $\mu$ g/mL. The complexes ARAGAL:VO, GMPOLY:VO and XGJ:VO did not alter the production of nitric oxide. ARAGAL and ARAGAL:VO, both at concentration of 10  $\mu$ g/mL increased the levels of IL-1 $\beta$  by ~360% and ~ 560%, respectively. GMPOLY and GMPOLY:VO concentration of 25  $\mu$ g/mL promoted an increase in the levels of this interleukin by ~ 660% and ~1050% respectively, while XGJ and XGJ:VO promoted equivalent stimulus by ~500% at concentration of 25  $\mu$ g/mL. GALMAN-B promoted an increase of 2 times in the production of IL-1 $\beta$  compared with GALMAN-A in the same concentration (25  $\mu$ g/mL). The levels of IL-1 $\beta$  produced by macrophages after treatment with preparations of galactomannans (GALMAN-A and -B) complexed with oxovanadium (IV/V) were equivalent varying from ~450% to ~630% at the concentration of 25  $\mu$ g/mL. For interleukin 6 were also observed differences in effects for the treatments. ARAGAL:VO (10  $\mu$ g/mL) and GMPOLY:VO (25  $\mu$ g/mL) promoted a twofold increase in the levels of IL-6 reaching by ~540% and ~790% respectively, when compared with the same concentrations of free forms. XGJ and XGJ:VO, both in concentration of 25  $\mu$ g/mL promoted an increase in the levels of IL-6 by ~200%. Galactomannans preparations (GALMAN-A and -B) showed different profiles for the levels of IL-6. GALMAN-A did not activate macrophages to produce IL-6, while GALMAN-B (25  $\mu$ g/mL) caused an increase by ~490% in the levels of this interleukin. Complexed forms at the same concentration increased the levels of IL-6 by ~450% and ~630% for GALMAN-A:VO and GALMAN-B:VO, respectively. Only GALMAN-B and GALMAN-B:VO increased production of IL-10 of equivalent manner by ~390% at concentration of 25  $\mu$ g/mL. The polymers and their oxovanadium complexes did not interfere in the production of TNF- $\alpha$  in peritoneal macrophages. All polysaccharides and their oxovanadium complexes with oxovanadium exhibited *in vitro* leishmanicidal effects on amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis*. The intensity of effect was similar to that observed for Glucantime<sup>®</sup> that promoted an inhibition by ~60% at concentration of 300  $\mu$ g/mL of antimonial. The polysaccharides and its complexes with oxovanadium (IV/V) assessed in this study promoted macrophages activation pathways, which may be directly involved in the intense leishmanicidal effect, also shown in this study.

**Keywords:** Macrophage, *Leishmania (L.) amazonensis*, polysaccharides, oxovanadium.

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são amplamente distribuídas pelo mundo afetando aproximadamente 12 milhões de pessoas em pelo menos 88 países. As manifestações clínicas são variadas e dependem do grau de comprometimento sistêmico e da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção. A organização mundial de saúde (OMS) considera uma de suas prioridades o controle desta patologia, visto que se estima a ocorrência de 400.000 casos novos no mundo a cada ano. No Brasil, as leishmanioses ocorrem de norte a sul, sendo tal incidência relacionada à ocupação de áreas florestais onde proliferam os vetores e reservatórios da doença (REITHINGER, 2007).

Os medicamentos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, em suas diferentes formas, são os antimoniais pentavalentes (PVAs) que apresentam várias restrições para o uso devido aos seus graves efeitos colaterais, além de um grande índice de resistência em alguns casos (RATH, 2003; AMEEN, 2010). Medicamentos de segunda escolha, como a anfotericina B, são utilizados quando os PVAs não podem ser administrados, porém também apresentam alta toxicidade. Miltefosina, um inibidor da biossíntese de alquil-fosfolipídios (pela inibição da enzima glicosomal acilcoenzima A aciltransferase) e indutor de apoptose, foi inicialmente utilizado como fármaco antitumoral e está licenciado em Portugal, Alemanha e Colômbia como o primeiro medicamento oral para o tratamento da leishmaniose visceral. Foi comprovada para este medicamento uma eficácia de cerca de 98%, sendo que até o momento os efeitos colaterais detectados são considerados mínimos e é utilizado com sucesso para tratar casos resistentes aos antimoniais. No entanto, já foi comprovada que a *Leishmania* spp. pode desenvolver resistência a miltefosina (JHA, 1999; PEREZ-VICTORIA, 2001; KEDZIERSKI, 2009; MALTEZOU, 2009).

Desta forma, torna-se fundamental o desenvolvimento de novos fármacos eficientes no tratamento destas doenças. Sendo *Leishmania* spp. parasita intracelular obrigatório em fagócitos, especificamente os macrófagos de hospedeiros suscetíveis os principais alvos de pesquisa para o tratamento desta patologia são substâncias que possam estimular as células hospedeiras para a produção de

mediadores que culminariam em uma atividade leishmanicida (JHA, 1999; PEREZ-VICTORIA, 2001).

Dentre estas substâncias destacam-se os polissacarídeos que possuem efeitos biológicos relacionados a modulação da resposta imune inata, ao sistema complemento e, mais especificamente, as funções de macrófagos. Os polissacarídeos mais estudados quanto aos efeitos como moduladores das funções biológicas (BRM) são as  $\beta$ -glucanas, porém, outros polissacarídeos como  $\alpha$ -glucanas, mananas, galactomananas, arabinogalactanas e xiloglucanas também têm se demonstrado como moduladores de funções biológicas (LEUNG, 2006).

Em adição, os complexos carboidratos-metais são descritos como úteis na aplicação farmacológica onde os carboidratos podem atuar como carreadores do metal. O vanádio, principalmente em seus estados de oxidação IV e V, tem sido alvo de grande interesse, por interagir com diferentes moléculas, originando complexos (CRANS, 1993; 1994; 1995), os quais podem exercer uma variedade de respostas biológicas como a indução do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), produção de interleucinas e de óxido nítrico (NO) por macrófagos (COHEN, 1996; YE, 1999a; YE, 1999b; TSUJI; SAKURAI, 1996; CORTIZO, 2000; MATTE, 2000).

Entre os ligantes preferenciais para o vanádio estão os carboidratos, tanto nas formas mono-, di- e polissacarídicas. Importantes efeitos leishmanicidas observados para o complexo galactomanana com oxovanádio (IV/V) (GMPOLY-VO) (NOLETO, 2002) motivaram avaliar os efeitos de complexos de diferentes polissacarídeos com vanádio em macrófagos peritoneais de camundongos e a atividade leishmanicida em macrófagos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Leishmania* spp.

*Leishmania* spp. é um protozoário que pertence à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, filo Sarcomastigophora. Ao longo do ciclo de vida as *Leishmania* spp. apresentam duas formas de desenvolvimento: a forma promastigota e a forma amastigota. No trato intestinal de vetores hematófagos do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), são encontradas as formas promastigotas metacíclicas, as quais são infectantes. Ao serem inoculadas em um hospedeiro mamífero através da picada do vetor fêmea infectado, invadem monócitos/macrófagos, sendo, portanto, parasitas intracelulares obrigatórios nos hospedeiros mamíferos. Uma vez internalizadas nestas células, nos fagolisossomos, as promastigotas se diferenciam em formas amastigotas não móveis que se multiplicam no vacúolo parasitóforo (RITTIG; BOGDAN, 2000).

A lise de macrófagos infectados libera amastigotas que, por sua vez, infectam outros macrófagos. Macrófagos infectados são ingeridos por flebotomíneos durante repasto sanguíneo, sofre lise no intestino do vetor liberando parasitas que se transformam para a forma promastigota não infectante. Essas formas passam por um processo de fixação à parede do intestino, liberação e migração anterior que é acompanhado por sua diferenciação para formas que não se dividem, promastigotas metacíclicos, as quais podem ser transmitidas quando o vetor faz outro repasto sanguíneo (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; CHAPPUIS, 2007) (Figura 1). Espécies de *Leishmania* são responsáveis por um espectro de doenças parasitárias conhecidas como leishmanioses com índices significativos em áreas tropicais e subtropicais (MURRAY, 2005; CHAPPUIS, 2007).

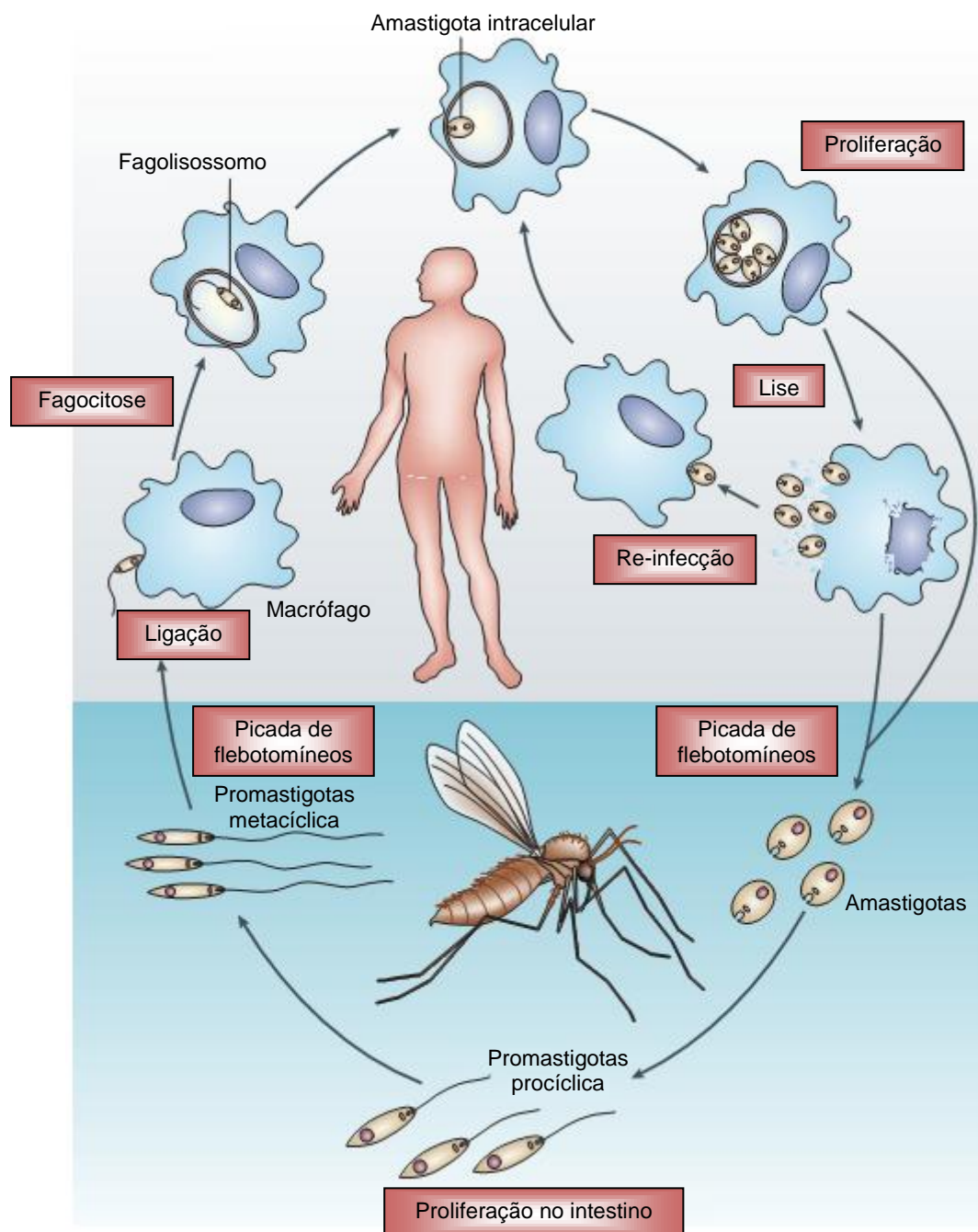


FIGURA 1. CICLO DE VIDA DE *Leishmania* spp.

Fonte: Adaptada (CHAPPUIS, 2007).

### 2.1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são, na maioria das vezes, zoonoses e estão amplamente distribuídas pelo mundo afetando aproximadamente 12 milhões de pessoas em pelo

menos 88 países. A organização mundial de saúde (OMS) considera uma de suas prioridades o controle desta patologia, visto que, estima-se a ocorrência de 400.000 casos novos no mundo a cada ano (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 23 dez. 2010).

Infecção por *Leishmania* spp. resulta em uma grande variedade de sintomas clínicos que podem ser classificados em quatro tipos principais: leishmaniose visceral (VL), leishmaniose mucocutânea (MCL), leishmaniose cutânea (CL) e leishmaniose dérmica pós-kala-azar (PKDL). A figura 2 representa a VL, MCL, CL e leishmaniose cutânea difusa (DCL).

A VL é a forma mais grave das leishmanioses. Embora a maioria das infecções com as espécies visceralizante seja assintomática, a taxa de letalidade da leishmaniose visceral sintomática é 100% dentro de dois anos de infecção, se não tratada. Leishmaniose visceral é uma doença sistêmica causada pela disseminação de *Leishmania* para o baço e fígado, que resultam em episódios de febre, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia. A PKDL ocorre no leste da África e na Índia (*L. donovani*) e é uma complicação da VL tratada e resulta na presença de múltiplas pápulas hipopigmentadas ou nódulos na pele (MURRAY, 2005).

A CL começa como uma pápula no local da picada do mosquito e desenvolve-se um nódulo duro ou uma úlcera aberta infiltrada que pode, ou não, curar-se espontaneamente. A MCL desenvolve-se como uma complicação da CL, com parasitas disseminando-se através do sistema linfático para colonizar as mucosas. Pacientes com MCL sofrem de úlceras destrutivas da mucosa, deixando os indivíduos afetados permanentemente desfigurados e propensos a comprometimento respiratório, infecções bacterianas secundárias e desnutrição (MURRAY, 2005).



FIGURA 2. LEISHMANIOSES EM HUMANOS

Fonte: Adaptada (MURRAY, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; SAKTHIANANDESWAREN; FOOT; HANDMAN, 2009).

Nota: Leishmanioses em seres humanos. (A) VL, a rápida proliferação dos parasitas no baço e no fígado leva ao alargamento maciço desses órgãos (hepaesplenomegalia). (B) MCL, é causada pela invasão da mucosa nasal e septo pelo parasito, embora com difícil confirmação parasitológica devido à escassez parasitária. (C) CL, muitas vezes se manifesta como uma lesão ulcerada no local da infecção. (D) DCL, lesões em placa infiltrada, com exulceração, tubérculos em face, orelha e membro superior.

A CL é endêmica em mais de 70 países do mundo, e 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria (Figura 3). Os dados de vigilância indicam que o número global de casos aumentou na última década, conforme documentado no Afeganistão, Bolívia, Brasil, Colômbia, Peru, e da Síria. Esses aumentos podem ser explicados em parte pela melhoria do diagnóstico e notificação dos casos, mas também resultam do controle inadequado dos vetores ou reservatórios, do aumento da detecção de CL associada com

infecções oportunistas (por exemplo, HIV/AIDS), e o surgimento de resistência a fármacos com atividade leishmanicida (REITHINGER, 2007).

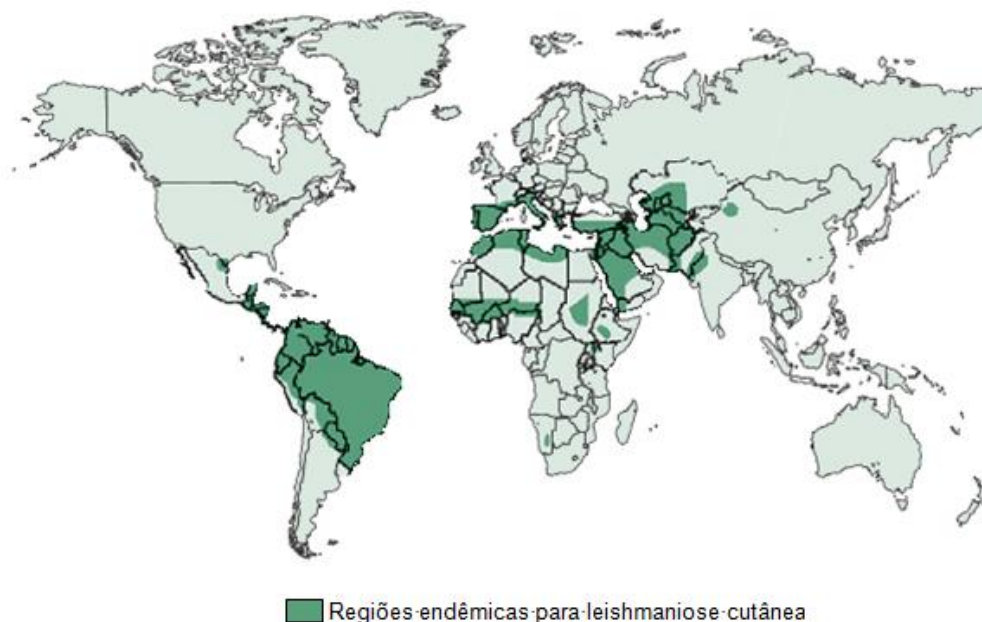


FIGURA 3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Fonte: Adaptada (REITHINGER, 2007).

Nota: No Brasil, as leishmanioses ocorrem de norte a sul, a incidência está relacionada à ocupação de áreas florestais onde proliferam os vetores e reservatórios da doença (REITHINGER, 2007).

No Brasil, a CL pode ser causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. O ciclo de transmissão de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* ocorre em áreas de florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão), e também é verificado nos estados das regiões Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná). O parasito foi isolado de roedores silvestres do gênero *Proechymis* e o *Oryzomys*. Os flebotomíneos vetores são *L. flaviscutellata*, *L. reducta* e *L. olmeca* nociva (Amazonas e Rondônia). A *L. amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver o quadro clássico da DCL (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

No Brasil, a DCL é causada pela *L. (L.) amazonensis*. Constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência

específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento; evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões cutâneas. A resposta à terapêutica é pobre ou ausente e geralmente a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) apresenta-se negativa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Nos últimos 14 anos (1994 a 2007) registraram-se no Brasil uma média de 29.150 casos de leishmaniose tegumentar. Em 2006 foram notificados 22.164 casos, e em 2007 foram 21.332 casos, representando um número bem menor do que aqueles registrados nos anos anteriores indicando uma possível redução na intensidade do processo de produção da doença. No Brasil, os percentuais de cura e abandono do tratamento em 2007 atingem 77,68% e 3,74%, respectivamente. Porém esses indicadores devem ser analisados para cada região, estado, município e localidade para se estabelecer a realidade de cada nível (MINISTÉRIO DA SAÚDE: Monitoramento e Vigilância da Leishmaniose Tegumentar no Brasil. Disponível em: <http://www4.ensp.fiocruz.br/Leishmaniose/lt/situacao-da-lt-no-brasil/>. Acesso em: 18 fev. 2011) (Figura 4A,B).

No período de 1988 a 2009, a leishmaniose tegumentar americana apresentou média anual de 26.021 casos registrados e coeficiente de detecção médio de 14,1 casos por 100.000 habitantes. Ao longo desse período, observou-se uma tendência no crescimento da endemia, registrando os coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes, respectivamente. A partir do indicador da densidade de casos, identificou-se, no período de 2001 a 2009, 36 circuitos de produção da doença de importância epidemiológica, os quais foram responsáveis por 43,7% do total de casos registrados em 2009, distribuídos em 349 municípios do total de 1.829 que apresentam casos em todo o país (MINISTÉRIO DA SAÚDE: Glossário – Leishmaniose Tegumentar Americana. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1560](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560)).



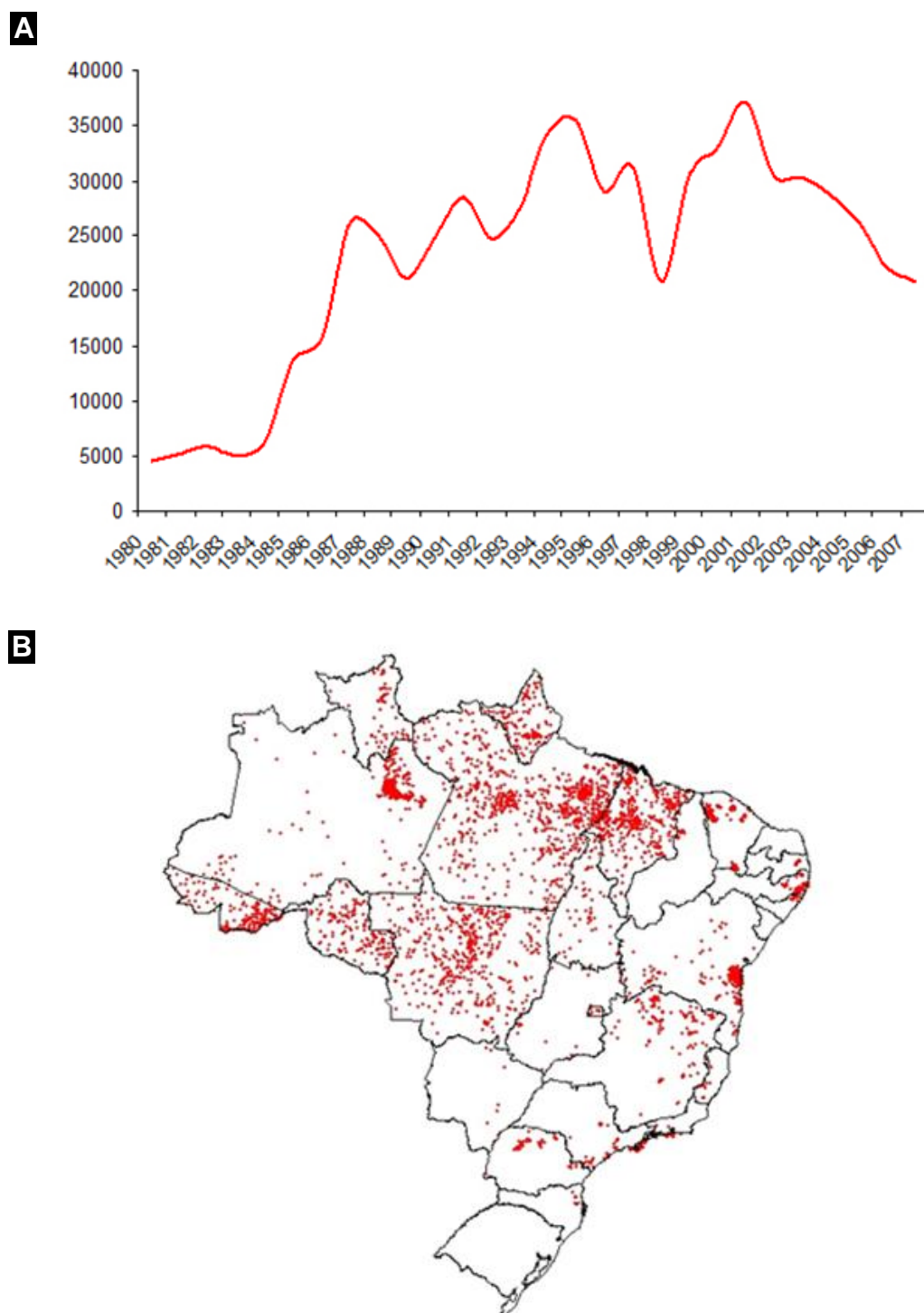


FIGURA 4. CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL

Fonte: Adaptada (MINISTÉRIO DA SAÚDE).

Nota: (A) Casos de leishmaniose tegumentar no período de 1980 a 2007. (B) Casos de leishmaniose tegumentar por município em 2007 (1 ponto = 5 casos).

O estabelecimento da infecção primária e o desenvolvimento da doença clínica dependem de fatores relacionados ao parasita, ao hospedeiro e ao vetor, além de dose ou rota de inoculação, assim como a manutenção de macrófagos em um estado inerte, inativado. A patogênese segue um conjunto complexo de interações entre muitos fatores desencadeados pelas respostas imune inata e adquirida do hospedeiro (p. ex., macrófagos, neutrófilos, células “Natural Killer” e células dendríticas). Estas respostas inflamatórias medeiam a expressão da doença e podem resultar em infecção assintomática ou subclínica, auto-cura de LCL, ou leishmaniose crônicas (p. ex., DCL e leishmaniose mucosa). Segue-se cura clínica quando os macrófagos tornam-se ativados a um estado leishmanicida. Isto é principalmente mediado por resposta celular T helper-1 (Th1), que também impede a recrudescência da infecção crônica latente (REITHINGER, 2007).

A resposta Th1 caracteriza-se por células dendríticas apresentadoras de antígenos, células T CD4 e CD8 e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, fator de necrose tumoral- $\alpha$ ). Citocinas supressoras como a interleucina-10 (IL-10) e o TGF- $\beta$ 1 caracterizam a resposta Th2, que desativam macrófagos e impedem a produção excessiva de citocinas protetoras. A IL-10 e o TGF- $\beta$ 1 são produzidas em grandes quantidades por células T regulatórias (Treg) encontradas nas lesões de pele de paciente com CL causada por *L. braziliensis*. Dessa forma, células T regulatórias são importantes, pois podem determinar resistência ou susceptibilidade a leishmaniose. A resposta Th2 é importante, pois provavelmente seja responsável por impedir a destruição exacerbada do tecido. No entanto esta desativação dos macrófagos promove a progressão da infecção intracelular (REITHINGER, 2007).

#### 2.1.1.1 Tratamento das leishmanioses

Os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes (antimoniato de N-metil glucamina e estibogluconato de sódio), anfotericina B, pentamidina, miltefosina, entre outros (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; REITHINGER, 2007; KEDZIERSKI, 2009), e estão subdivididos em fármacos de primeira escolha e alternativos, que podem ser mais bem visualizados no esquema abaixo (Figura 5).



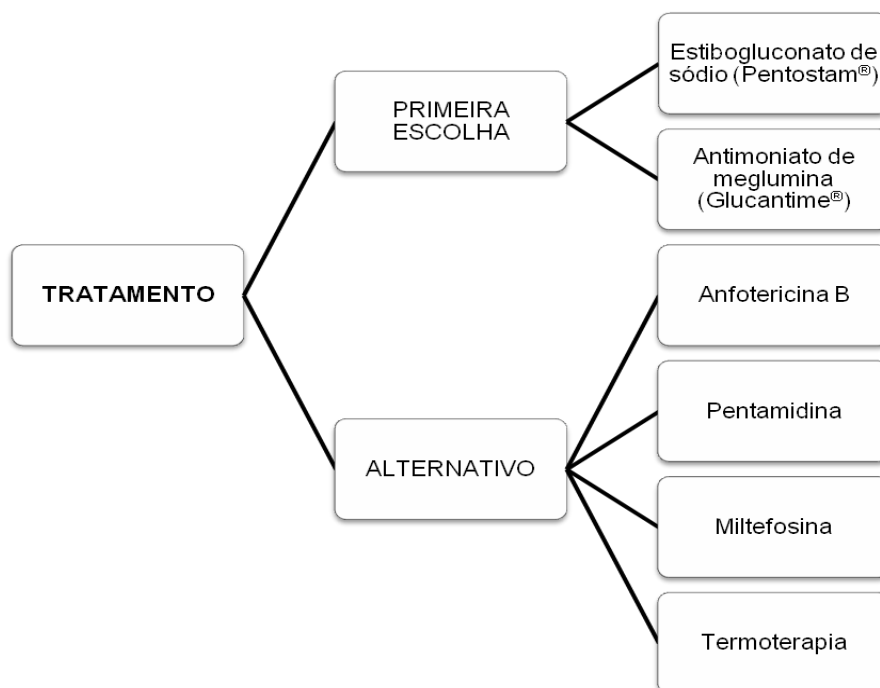


FIGURA 5. TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Fonte: Adaptada (REITHINGER, 2007; KEDZIERSKI, 2009).

Apesar do uso medicinal de compostos de antimônio já ser conhecido desde a Antiguidade, séculos antes da era cristã, para diversos fins terapêuticos, somente em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna, um cientista brasileiro, observou que o tártaro emético, um composto antimonial, era eficaz na terapêutica da leishmaniose tegumentar americana (VIANNA, 1912). Devido a toxicidade e aos graves efeitos colaterais, os antimoniais trivalentes foram sendo substituídos por compostos contendo antimônio pentavalente. Bramachari, em 1920, desenvolveu o primeiro composto à base de antimônio pentavalente, o uréia estibamina, derivado uréico do ácido p-aminofenil estibínico. Em 1936, Schmidt introduziu na terapia médica o gluconato de antimônio (V) sódico, conhecido comercialmente como Solustibosan® (Bayer) ou Pentostam® (Glaxo Wellcome). Durante a Segunda Guerra Mundial, surgiu na França um medicamento, o antimoniato de N-metil glucamina, comercializado como Glucantime® (Rhône-Poulenc-Rohrer) ou antimoniato de meglumina. Antimoniais pentavalentes são considerados 10 vezes menos tóxicos

em células de mamíferos, quando comparados aos antimoniais trivalentes (tártaro emético) (RATH, 2003).

No Brasil, antimoniato de metilglucamina é a preparação utilizada como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose. Esse fármaco é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da N-metil-glucamina, sendo a última obtida previamente a partir da aminação redutora da glicose em presença de metilamina. O composto resultante é solúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos (RATH, 2003).

Antimoniais pentavalentes são considerados pró-fármacos, pois devem ser reduzidos a antimoniais trivalentes para exercerem atividade leishmanicida. O mecanismo de ação dessa atividade pode envolver apoptose e a inibição da tripanotona redutase. Tripanotona é o principal tiol em *Leishmania* e os antimoniais trivalentes inibem a tripanotona redutase induzindo uma perda intracelular de tióis e um desequilíbrio letal de tióis, levando ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (MALTEZOU, 2009).

Após administração endovenosa ou intramuscular, o antimoniato de metilglucamina é rapidamente absorvido e, praticamente, 90% do antimônio é excretado nas primeiras 48 h pelos rins. Em consequência, faz-se necessária a administração de doses elevadas do fármaco, em regime contínuo, para garantir um elevado teor de antimônio nos tecidos e, assim, obter a eficácia do tratamento. Efeitos colaterais como nefrites, distúrbios gastrintestinais, cardiovasculares e respiratórios tem sido observados. Em determinados casos, além de destruir o parasita, a necessidade de altas doses do medicamento pode levar o paciente ao óbito. O antimônio permanece por longo tempo em determinadas partes do corpo do paciente podendo ser detectado no cabelo após um ano do término do tratamento (RATH, 2003).

Estudos indicam que a administração oral das preparações a base de antimônio não são satisfatórias, provavelmente devido à alta solubilidade dos compostos em meio aquoso e a dificuldade de serem absorvidos e transportados através da barreira lipofílica intestinal (KEDZIERSKI, 2009).

Além dos antimoniais, outros fármacos têm sido empregados no tratamento (alternativo) das diversas formas das leishmanioses, entre as quais se destacam a anfotericina B, a pentamidina e a miltefosina (MURRAY, 2005).

A anfotericina B é um antibiótico polieno que tem sido usado como um tratamento alternativo para leishmaniose desde a década de 1960. Este composto tem atividade seletiva contra fungos, bem como para a *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*. O mecanismo de ação sugerido envolve a seletividade da anfotericina B para se ligar ao ergosterol, o esteroide predominante nestes microrganismos, em relação ao colesterol, o esteroide predominante nas células de mamíferos, aumentando a permeabilidade da membrana celular e, conseqüentemente, morte dos protozoários (CROFT, 2006). Com o objetivo de diminuir a toxicidade, atualmente são utilizadas formulações lipídicas de anfotericina B (AmBisome, Amphocil e Abelcet), as quais tem sido eficazes no tratamento da leishmaniose visceral. Estas preparações apresentam alto custo, o que inviabiliza sua utilização por grande parte da população afetada (KEDZIERSKI, 2009).

A pentamidina, substância do grupo das diamidas é utilizada no tratamento das leishmanioses como alternativa, na impossibilidade de utilização de antimoniais ou anfotericina B. A pentamidina atua sobre o DNA de *Leishmania*, ligando-se preferencialmente em seqüências AT no DNA do cinetoplasto levando a destruição da mitocôndria e morte do parasita. A pentamidina é comercializada sob o nome de Lomidina® e encontra-se disponível, nos Estados Unidos, somente no Serviço de Medicamentos para Doenças Parasitárias do Serviço de Saúde Pública. Os graves efeitos colaterais (toxicidade renal, cardiotoxicidade, hipotensão e diabetes induzida) limitam a utilização deste fármaco em muitos pacientes (BALAÑA-FOUCE, 1998; CROFT, 2006; KEDZIERSKI, 2009).

Recentemente, a miltefosina (hexadecilfosfocolina), um alquilfosfolípido, é o primeiro medicamento oral administrado para leishmaniose visceral. Até o momento este fármaco tem exibido alta eficácia, incluindo os casos sem resposta aos antimoniais. Miltefosina é licenciado em Portugal, Alemanha e Colômbia. Fatores limitantes ao amplo uso de miltefosina incluem seu alto potencial teratogênico, proibido em mulheres em idade fértil que pode engravidar até dois meses após a utilização do fármaco e seu tempo de meia-vida longo (cerca de 150 horas), o que pode facilitar o aparecimento de resistência (KEDZIERSKI, 2009; MALTEZOU, 2009).

Embora existam estas alternativas para o tratamento das leishmanioses, o tratamento clássico a base antimônio pentavalente, ainda é o mais utilizado.

Considerando os graves efeitos colaterais apresentados pelos medicamentos em uso e, principalmente a resistência desenvolvida pelo parasita a estas drogas, é de grande relevância a busca por novos fármacos com atividade leishmanicida. Neste sentido, uma alternativa interessante são compostos que possuem efeitos imunomodulatórios tendo como principais alvos células dendríticas, monócitos ou macrófagos (KEDZIERSKI, 2009), uma vez que estas células são hospedeiras para o parasita. Para melhor compreender como os imunomoduladores podem contribuir para os macrófagos exercerem sua ação microbica, em especial contra *Leishmania*, uma breve revisão sobre macrófagos enfatizando as vias envolvidas na atividade leishmanicida será apresentada a seguir.

## 2.2 MACRÓFAGOS

Macrófagos estão presentes em praticamente todos os tecidos. Eles diferenciam-se de células mononucleares circulantes no sangue periférico (PBMC), que migram para o tecido em estado estacionário ou em resposta à inflamação. Estas células mononucleares circulantes no sangue periférico desenvolvem-se a partir de uma célula progenitora mielóide comum na medula óssea que é a precursora de muitos tipos diferentes de células, incluindo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs) e mastócitos. Durante o desenvolvimento de monócitos, as células progenitoras mielóides (chamadas de unidades formadoras de colônia granulócito/macrófago) seqüencialmente originam monoblastos, pró-monócitos e, finalmente, monócitos, que são liberados da medula óssea para a corrente sanguínea. Os monócitos migram do sangue para os tecidos para originar macrófagos tecido-específico de longa duração dos ossos (osteoclastos), dos alvéolos, do sistema nervoso central (microglia), do tecido conjuntivo (histiócitos), do trato gastrointestinal, do fígado (células de Kupffer), do baço e do peritônio (Figura 6) (GORDON; TAYLOR, 2005).

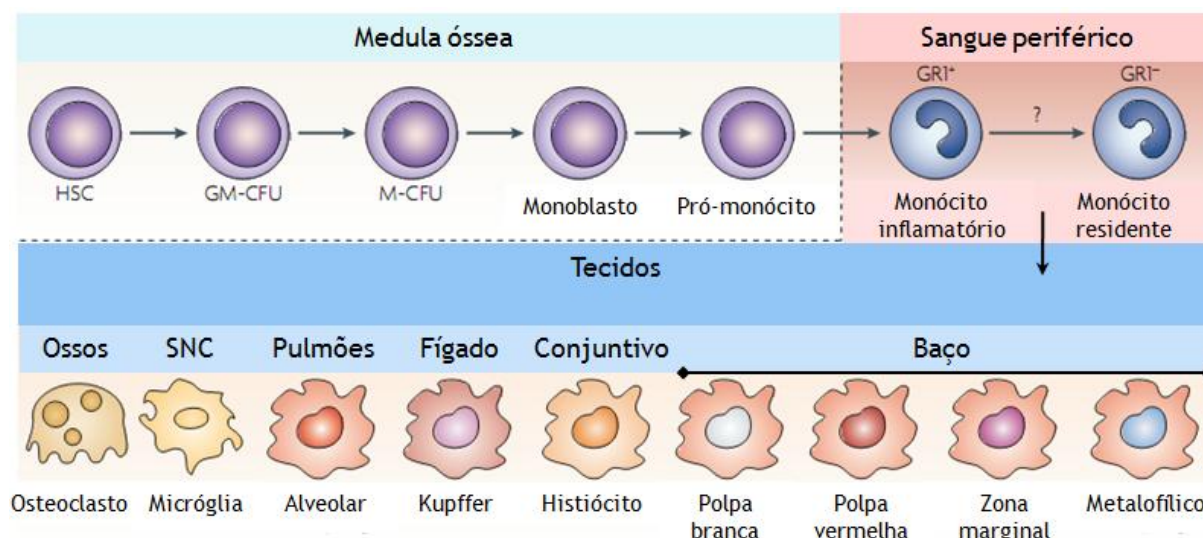


FIGURA 6. HETEROGENEIDADE DE MONÓCITOS

Fonte: Adaptada (GORDON; TAYLOR, 2005; MOSSER; EDWARDS, 2008).

Nota: Os monócitos originam-se na medula óssea a partir da célula-tronco hematopoiética (HSC). Esta célula sofre, em resposta ao fator estimulante de colônia-macrófago, etapas de diferenciação sequenciais tornando-a comprometida com a linhagem mielóide e, posteriormente, com a linhagem monocítica. A HSC diferencia-se em unidade formadora de colônia granulócito-macrófago (GM-CFU), unidade formadora de colônia-macrófago (M-CFU), monoblasto, pró-monócito e, finalmente, monócitos, que são liberados da medula óssea para a corrente sanguínea. Monócitos migram do sangue para os tecidos para originar macrófagos tecido-específico de longa duração. **GR1<sup>+</sup>** (também conhecido como **Ly6**): monócitos inflamatórios. **GR1<sup>-</sup>**: monócitos residentes.

Os monócitos inflamatórios (agora definidos como monócitos **CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>**) são recrutados e diferenciam-se em macrófagos no local da inflamação podendo exibir diferentes estados de ativação que podem ser classificados como descrito na figura 7: a) a ativação clássica, que pode ser induzida por cultura *in vitro* de macrófagos com interferon- $\gamma$  e lipopolissacarídeo (LPS), que induz a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) e está associada com alta atividade microbicida, produção de citocinas pró-inflamatórias e imunidade celular; b) outra via de ativação chamada de ativação alternativa leva a produção de IL-4 ou IL-13 e está associada com o reparo tecidual e imunidade humoral; c) a ativação inata é mediada por receptores, tais como receptores Toll-like (a maioria dos quais são expressos por células da linhagem monócito/macrófago) e está associada com atividade microbicida e produção de citocinas pró-inflamatórias; d) desativação, que pode ser induzida por citocinas como

IL-10 ou pelo fator de transformação do crescimento-beta ( $\text{TGF-}\beta$ ) e está associada com a produção de citocinas anti-inflamatórias e expressão reduzida de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade da classe dois (MHC-II) (GORDON; TAYLOR, 2005; MOSSER; EDWARDS, 2008).

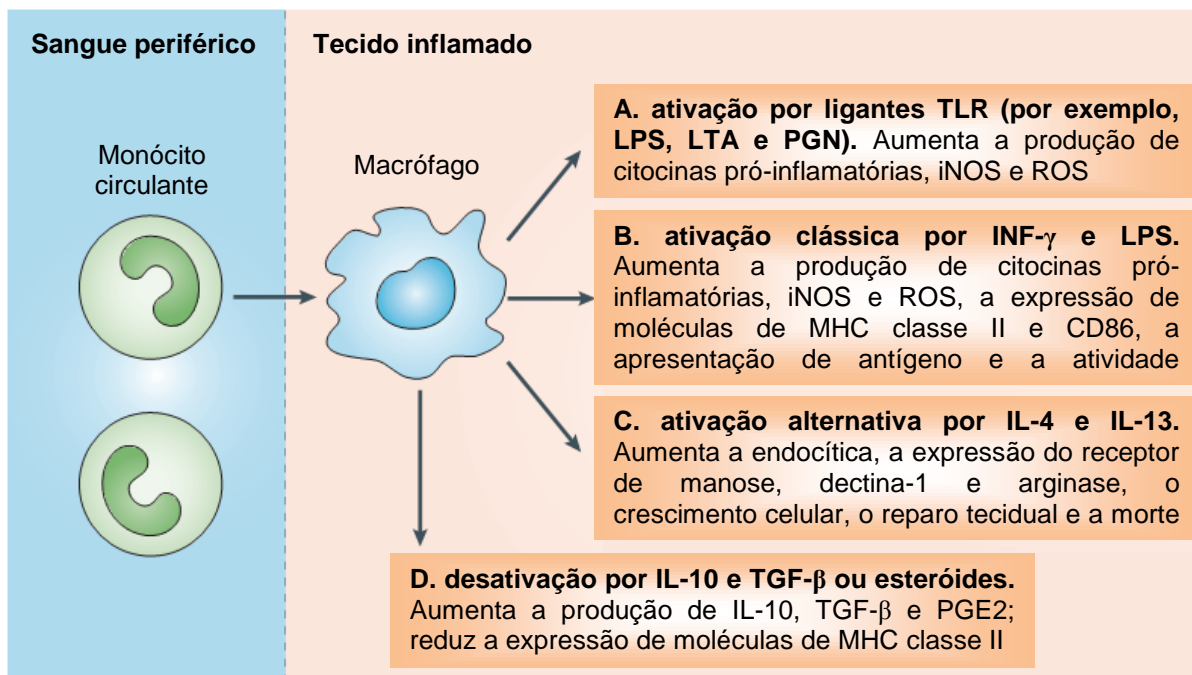


FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DA HETEROGENEIDADE DE MACRÓFAGOS DURANTE INFLAMAÇÃO

Fonte: Adaptada (GORDON; TAYLOR, 2005; MOSSER; EDWARDS, 2008).

Nota: TLR:receptor "Toll-like". LPS: lipopolissacarídeo. LTA: ácido lipoteicoico. iNOS: óxido nítrico sintase induzível. ROS: espécies reativas de oxigênio.  $\text{INF-}\gamma$ : interferon-gama. MHC: complexo principal de histocompatibilidade. IL-4: interleucina-quatro. IL-13: interleucina-treze. IL-10: interleucina-dez.  $\text{TGF-}\beta$ : fator de transformação do crescimento-beta. PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E dois.

### 2.2.1 Óxido nítrico e citocinas produzidas por macrófagos

O sistema imunológico inato é um conjunto de respostas rápido do hospedeiro contra patógenos. As células envolvidas neste sistema incluem os macrófagos, os neutrófilos e as células "Natural Killer" chamadas de NK. Todas estas células exibem em suas membranas receptores que reconhecem especificamente padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (MEDZHITOV, 2001). Após interação

do patógeno com estes receptores, os macrófagos tornam-se ativados e podem inibir a replicação do patógeno através da liberação de uma grande variedade de moléculas efetoras, como por exemplo, as citocinas e o óxido nítrico (NO) (LOWENSTEIN; PADALKO, 2004). A seguir na figura 8 está resumido de forma esquemática como componentes da parede celular de bactérias e fungos podem desencadear a cascata de sinalização da imunidade inata, levando a expressão de iNOS. Inicialmente, o lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede de bactérias Gram-negativas, pode ligar-se a proteínas de ligação de LPS (LBP), que entrega o LPS para CD14, um receptor de alta afinidade para LPS. A ligação de LPS ao CD14, favorece à associação de CD14 com o complexo TLR4-MD-2 e induz a dimerização de TLR4. Após a ativação de TLR4, ele recruta a proteína adaptadora MyD88, que está associada com o receptor de interleucina-1-associado a quinase (IRAK). IRAK é então fosforilado e associado com a proteína adaptadora fator de necrose tumoral-associado ao fator 6 (TRAF-6). A oligomerização de TRAF-6 ativa a proteína quinase ativada por mitógeno (MAP3K), que, direta ou indiretamente, leva à ativação de I $\kappa$ B quinase 1 (IKK1) e I $\kappa$ B quinase 2 (IKK2). Estas quinases fosforilam I $\kappa$ B em resíduos de serina, marcando, assim, I $\kappa$ B para a degradação e liberação de NF- $\kappa$ B, que se move para o núcleo e induz a ativação da transcrição de uma grande variedade de genes inflamatórios e da resposta imune, entre os quais está o gene da iNOS (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; LOWENSTEIN; PADALKO, 2004).

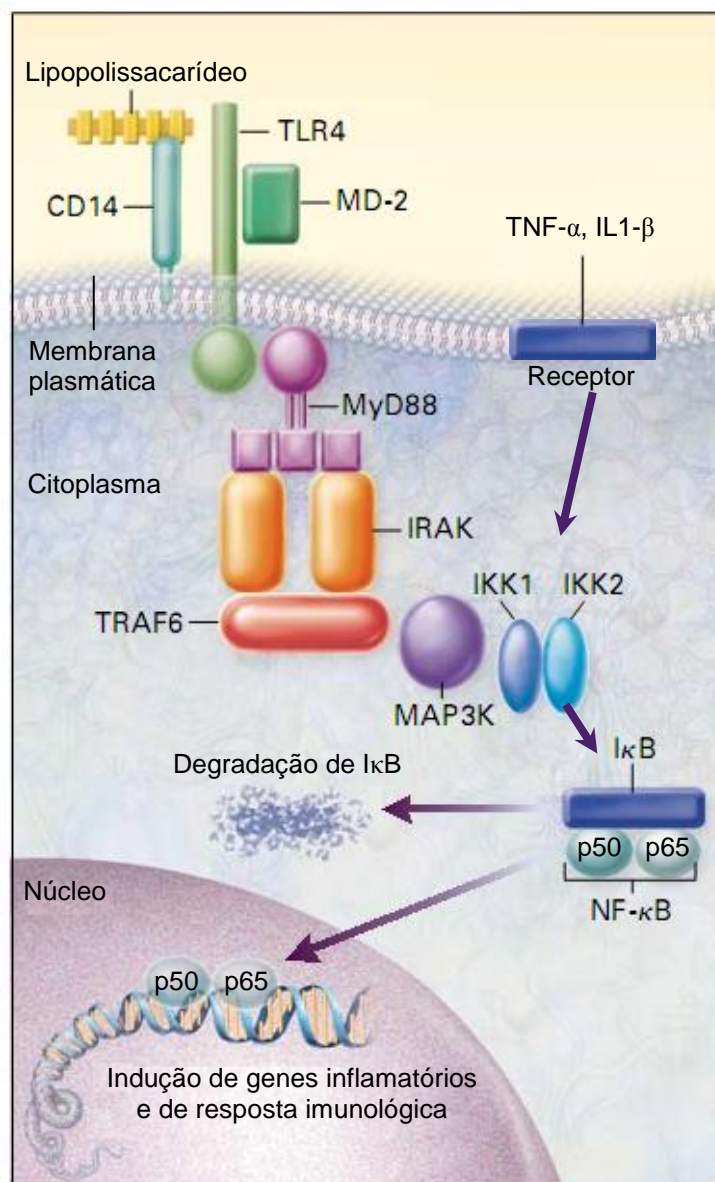


FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DE GENES PARA A iNOS

Fonte: Adaptada (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; BAUD; KARIN, 2001).

Nota: A ligação de LPS ao CD14 favorece a associação de CD14 com o complexo TLR4-MD2. Após a ativação de TLR4, MyD88 é recrutada e IRAK é fosforilada ativando TRAF6. TRAF6, por sua vez, ativa IKK1 e IKK2 que fosforilam IκB marcando-o para degradação e liberando NF-κB. NF-κB é translocado para o núcleo e induz a ativação da transcrição de genes inflamatórios e da resposta imune, entre os quais está o gene da iNOS. A ligação de TNF-α ao seu receptor também causa a ativação de IKK, resultando na liberação de IκB. IκB: inibidor kappa B. IKK1: quinase um do inibidor kappa-B. IKK2: quinase dois do inibidor kappa B. IL-1β: interleucina-um beta. IRAK: quinase associada ao receptor de interleucina-um. LPS: lipopolissacarídeo. MAP3K: proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno: MD-2: proteína de diferenciação mielóide-dois. MyD88: fator da diferenciação mielóide oitenta e oito. NF-κB: fator nuclear-kappa B. TLR4: receptor "Toll like" quatro. TNF-α: fator de necrose tumoral-alfa. TRAF6: fator de necrose tumoral associado ao fator seis.



Nos humanos, existem três isoformas distintas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS)) (ALDERTON, 2001). As isoformas nNOS e eNOS são expressas em neurônios e células endoteliais, respectivamente. Elas são  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente e expressas de forma constitutiva nestas células. Em contraste, a isoforma iNOS é  $\text{Ca}^{2+}$ -independente e é expressa nos fagócitos após estímulo adequado, como aquele causado por  $\text{TNF-}\alpha$  e outros agentes como o LPS (FANG, 2004). Cada polipeptídeo de NOS é constituído por um domínio N-terminal oxigenase e um domínio C-terminal redutase, com uma seqüência de reconhecimento para a proteína ligadora de  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulina (CaM) localizada entre os dois domínios (Figura 9) (STUEHR, 1999; ALDERTON, 2001).

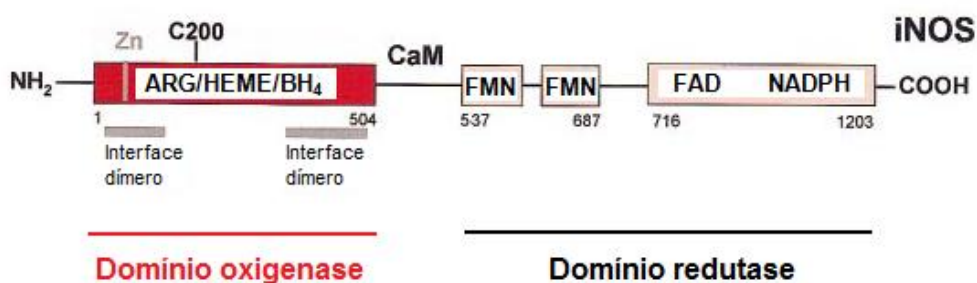


FIGURA 9. ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS DA iNOS HUMANA

Fonte: Adaptada (ALDERTON, 2001).

Nota: A iNOS é composta por dois domínios distintos: um domínio redutase e um domínio oxigenase. O domínio redutase recebe elétrons da NADPH e os transfere para o domínio oxigenase, permitindo-o ligar e ativar o  $\text{O}_2$  para sintetizar NO. iNOS: óxido nítrico sintase induzível. NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato. NO: óxido nítrico.  $\text{O}_2$ : oxigênio molecular.

A região central liga o grupo heme (HEME), tetrahydrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), L-arginina (ARG), e constitui o centro ativo onde ocorre a catálise. O domínio redutase liga FMN, FAD e NADPH. Durante a síntese de NO a flavina redutase recebe elétrons da NADPH e os transfere para o ferro do grupo heme, que lhe permite ligar e ativar o  $\text{O}_2$  e catalisar a síntese de NO. A hidroxilação da L-arginina gera  $\text{N}^\omega$ -hidroxi-L-arginina como intermediário. A segunda etapa converte  $\text{N}^\omega$ -hidroxi-L-arginina aos produtos NO e citrulina (Figura 10) (STUEHR, 1999; LOWENSTEIN; PADALKO, 2004).

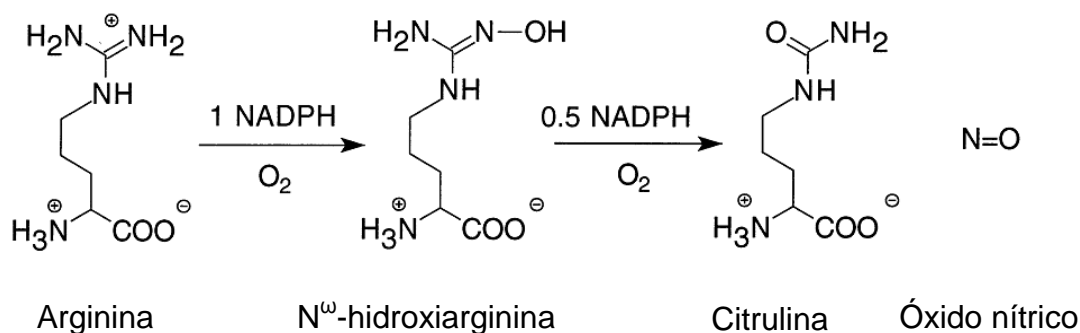


FIGURA 10. SÍNTESE DE ÓXIDO NITRICO CATALISADA PELA iNOS

Fonte: Adaptada (STUEHR, 1999).

Nota: A hidroxilação da L-arginina gera N<sup>ω</sup>-hidroxi-L-arginina como intermediário. A segunda etapa converte N<sup>ω</sup>-hidroxi-L-arginina aos produtos citrulina e NO. NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato. NO: óxido nítrico. O<sub>2</sub>: oxigênio molecular.

Após a indução, a iNOS produz continuamente NO até a enzima ser degradada. O NO produzido pela iNOS é rapidamente convertido em outras espécies reativas de nitrogênio, como os peroxonitritos que têm sido considerados como responsáveis pelos efeitos microbicidas, antivirais, antiparasitários e antitumorais (MACMICKING, 1997; BOGDAN, 2001).

A via de ativação da transcrição de iNOS, envolve a proteína adaptadora MyD88 (Figura 8), que pode direcionar para a ativação de MAP3K, que fosforila TBP (proteína de ligação a TATA) tornando-a capaz de ligar-se a TATA box e formar o complexo de transativação ativo com a proteína de ligação do elemento responsivo ao cAMP (CBP) e NF-κB. Este complexo de transativação regula positivamente a produção de muitos mediadores inflamatórios, tais como TNF-α, IL-1β e IL-6 (LIU; SHEPERD, NELIN, 2007).

O TNF-α é uma potente citocina produzida por vários tipos de células, incluindo macrófagos, monócitos, linfócitos, queratinócitos e fibroblastos, em resposta à inflamação, infecção e outros estresses. TNF-α induz um amplo espectro de respostas celulares, incluindo a ativação e migração de linfócitos e leucócitos, febre, resposta de fase aguda, proliferação celular, diferenciação e apoptose (BAUD; KARIN, 2001). Os efeitos do TNF-α são mediados por dois receptores distintos, TNFR1 e TNFR2. A ligação de TNF-α aos receptores induz a trimerização do receptor e o recrutamento de várias proteínas de sinalização pelos domínios

citoplasmáticos dos mesmos. A primeira proteína recrutada pelo TNFR1 é o domínio de morte associado ao TNFR1 (TRADD), que serve como plataforma para recrutar pelo menos mais três mediadores, proteína 1 de interação com o receptor (RIP1), domínio de morte associado ao Fas (FADD) e fator 2 associado ao receptor de TNF (TRAF2). A ligação de TNF- $\alpha$  ao TNFR2 resulta em recrutamento direto de TRAF2, que recruta TRAF1. TRAF2 desempenha um papel central nos eventos iniciais, comuns a TNFR1 e TNFR2, que levam à ativação de IKK e MAPK (JNK e p38), resultando na liberação de NF- $\kappa$ B e indução da expressão de iNOS (BAUD; KARIN, 2001; CHADWICK, 2008; TIDBALL; VILLALTA, 2009). A figura 8 ilustra a ativação de IKK pela ligação de TNF- $\alpha$  ao seu receptor.

A IL-1 é a principal citocina pró-inflamatória de “alarme” secretada por macrófagos, que atua através da indução de uma variedade de citocinas, quimiocinas e mediadores de pequenas moléculas. IL-1 também induz a expressão de moléculas de adesão e integrinas nos leucócitos, células endoteliais e outras, promovendo a infiltração celular, inflamação e reparo tecidual em locais danificados. Até o momento são conhecidos onze proteínas pertencentes a família de interleucina-1. Destes a IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  são as principais moléculas agonistas, enquanto que o antagonista do receptor IL-1 (IL-1Ra) é um inibidor fisiológico da ação da IL-1 (DINARELLO, 1996 e 2009).

A IL-1 $\beta$  é secretada, enquanto que IL-1 $\alpha$  geralmente está associada com a membrana plasmática da célula produtora e, assim, age localmente. IL-1 $\beta$  é produzida principalmente por monócitos e macrófagos, enquanto que a expressão de IL-1 $\alpha$  abrange outras células como os queratinócitos e células endoteliais. A atividade biológica de ambas interleucinas é estreitamente regulada. IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são expressas em baixos níveis sob condições normais e requerem indução tanto em nível transcricional quanto em nível traducional (SIMS; SMITH, 2010). IL-1 $\beta$  induz a produção de várias enzimas, tal como a iNOS levando a liberação de NO (GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010).

A IL-6 é outra citocina importante produzida por macrófagos e está diretamente envolvida em processos inflamatórios. IL-6 promove a ativação e proliferação de linfócitos, diferenciação de células B, recrutamento de leucócitos, e a indução de uma resposta protéica de fase aguda no fígado. Entre os estímulos que

levam a produção da IL-6 destacam-se o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , endotoxinas bacterianas, exercício físico e estresse oxidativo (STENVINKEL, 2005).

A IL-6 interage com seu receptor formando um complexo constituído por duas moléculas de IL-6 e duas proteínas do receptor de IL-6 e duas proteínas de gp130. Esta última sofre dimerização e, então, ativa JAK tirosina quinases citoplasmática. Estas quinases fosforilam resíduos de tirosinas e recruta STAT3, que dimeriza-se e é translocado para o núcleo e induz a expressão gênica de proteínas de fase aguda (Figura 11) (KISHIMOTO, 2006).

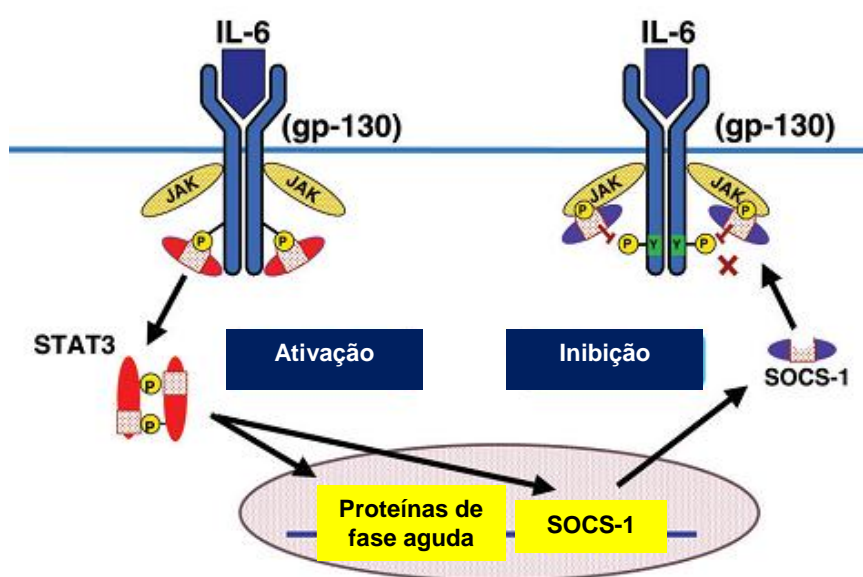


FIGURA 11. SINALIZAÇÃO E REGULAÇÃO DE IL-6

Fonte: Adaptada (KISHIMOTO, 2006).

Nota: A interação de IL-6 com seu receptor ativa JAK que fosforila STAT3. STAT3 é translocado para o núcleo e induz a expressão gênica de proteínas de fase aguda. STAT3 também ativa SOCS-1 que liga-se a JAK regulando negativamente a transdução de sinal de gp130. JAK: Janus quinase. STAT3: transdutor de sinal e ativador de transcrição três. SOCS-1: supressor de sinalização de citocinas-um.

A via sinalização de IL-6 é regulada por “feedback” negativo pelo supressores de sinalização de citocinas (SOCS). A interação IL-6/receptor de IL-6 leva a ativação de STAT3, que ativa SOCS-1. SOCS-1 liga-se a JAK atuando como um regulador negativo da transdução de sinal de gp130 (KISHIMOTO, 2006). IL-6 secretada pode

atuar tanto local quanto sistemicamente, promovendo crescimento e diferenciação celular e prevenindo apoptose (ASSOIAN; KLEIN, 2008; NAUGLER; KARIN, 2008).

A ativação imunológica é essencial para eliminação de patógenos, porém um estímulo excessivo pode resultar em uma produção exacerbada destes mediadores, levando a um dano tecidual não desejado ou até a morte. Uma maneira de regular esta ativação se dá através da produção de imunoreguladores durante o processo inflamatório. Um desses imunoreguladores é a IL-10, uma citocina anti-inflamatória que atua durante a infecção inibindo a atividade de células Th1, NK e macrófagos. Em consequência, IL-10 pode tanto impedir a eliminação do patógeno quanto melhorar a imunopatologia (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008).

A ação imunoregulatória da IL-10 envolve a inibição da expressão de MHC-II e moléculas coestimulatórias B7-1/B7-2 em monócitos e macrófagos limitando a produção de citocinas pró-inflamatórias (incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas (MCP-1, MCP5, RANTES, IL-8, IP-10 e MIP-2) (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008).

## 2.3 IMUNOMODULADORES

Imunomoduladores, também classificados como modificadores da resposta biológica (BRMs), são substâncias capazes de modificar a resposta imunológica. Os principais BRMs conhecidos são citocinas produzidas endogenamente por células do sistema imune, derivados de bactérias, fungos, algas e plantas. Os derivados exógenos podem ser ácido nucléico (CpG), lipídios (ácido lipoteicoico), proteínas ou polissacarídeos. A ligação destas moléculas a receptores de reconhecimento padrão presente na superfície de macrófagos desencadeia uma resposta imune, que pode resultar em atividade anti-viral, anti-bacteriana, anti-fúngica, anti-parasitária e anti-tumoral (LEUNG, 2006).

Polissacarídeos de diferentes fontes já foram caracterizados como modificadores da resposta biológica, sendo, portanto, os imunomoduladores de maior ocorrência na natureza. Atualmente muitos polissacarídeos são utilizados por suas propriedades terapêuticas, principalmente na modulação do sistema imunológico (LEUNG, 2006; ROSÁRIO, 2011). Os polissacarídeos podem atuar como BRMs não apenas em suas formas nativas, mas também complexados com metais. Na forma de complexos sugere-se que os polímeros possam atuar também

como carreadores do metal. A química de coordenação de carboidratos com metais teve início com o desenvolvimento de complexos de carboidratos com boro por Böeseken em 1949 para determinar a configuração glicosídica de carboidratos. Desde então, carboidratos quimicamente modificados tornaram-se disponíveis pela aplicação de métodos sintéticos modernos para a síntese de carboidratos. Simultaneamente, a química de coordenação desses derivados tem se desenvolvido (ALEXEEV, 2004).

As aplicações dos complexos carboidratos-metais vêm crescendo, em especial o estudo dos efeitos destes complexos em diferentes sistemas biológicos com finalidade terapêutica. Diferentes metais com relevância biológica são utilizados na produção de complexos carboidratos-metais. Destaque tem sido dado para antimônio, paládio, platina, ouro, rutênio e vanádio (NAVARRO, 2010).

Os estudos da complexação de polissacarídeos com metais, em especial o vanádio colocaram estas moléculas como promissoras no desenvolvimento de fármacos com atividade leishmanicida. Uma galactomanana (GMPOLY) isolada do líquen *Ramalina celastri* foi complexada com vanádio, obtendo o complexo GMPOLY-VO. GMPOLY (100 µg/mL) e GMPOLY-VO (1 µg/mL) exerceram efeito leishmanicida de ~98% sobre a forma amastigota de *Leishmania amazonensis* (NOLETO, 2002). Os autores sugerem que o potente efeito do complexo GMPOLY-VO pode ser atribuído a presença do metal.

Outros complexos desse metal com diferentes ligantes orgânicos também exibiram atividade leishmanicida. Dois compostos de perovovanádio (pV), bisperoxovanádio 1,10-fenantrolina (bpV(phen)) e bisperoxo (piconolato) oxovanadato (V) (bpV(pic)), controlaram a progressão das leishmanioses causadas por *Leishmania major* e *Leishmania donovani* em camundongos BALB/c pela modulação da atividade microbicida dependente de NO (MATTE, 2000). Diperoxovanadato combinado com doses sub-ótimas gluconato antimônio de sódio (SAG) foi eficaz no combate à infecção experimental de camundongos BALB/c com *Leishmania donovani* resistente a antimônio (HALDAR, 2009).

Compostos metálicos oferecem excelentes oportunidades para encontrar novos fármacos contra as principais doenças causadas por protozoários tais como a malária, a doenças de Chagas e as leishmanioses. As doenças tropicais constituem

um grave problema de saúde pública e um grande desafio para a descoberta de novos fármacos (NAVARRO, 2010).

### 3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Como descrito anteriormente, os medicamentos atualmente utilizados para o tratamento das leishmanioses apresentam graves efeitos colaterais, restrição de uso para pacientes com cardiopatias, gravidez entre outros, e alto índice de desenvolvimento de resistência. Estudos de complexos de polissacarídeos com vanádio mostraram que estes compostos possuem potente atividade leishmanicida contra a forma amastigota deste parasita, que é a forma alvo da ação dos medicamentos utilizados na terapia destas patologias (NOLETO, 2002). Tendo em vista estas importantes informações, a capacidade de modificar a resposta biológica (BRM) atribuída a diferentes polissacarídeos, torna-se relevante intensificar os estudos com estas moléculas visando descobrir novos compostos com atividade leishmanicida e contribuir para o entendimento do mecanismo de ação de complexos de polissacarídeos com vanádio.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos de diferentes polissacarídeos e seus complexos com oxovanádio (IV/V) sobre a produção de NO e a produção de citocinas por macrófagos, e atividade leishmanicida sobre as formas amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) amazonensis*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os efeitos *in vitro* dos complexos com oxovanádio (IV/V) ARAGAL:VO, GMPOLY:VO e XGJ:VO sobre macrófagos quanto a capacidade de ativação destas células através da determinação da produção de NO;
- b) Avaliar os efeitos *in vitro* dos polissacarídeos ARAGAL, GMPOLY, XGJ, GALMAN-A, GALMAN-B e seus complexos com oxovanádio (IV/V) sobre macrófagos quanto a capacidade de ativação destas células através da determinação da produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10;



c) Avaliar os efeitos *in vitro* dos polissacarídeos ARAGAL, GMPOLY, XGJ GALMAN-A, GALMAN-B e seus complexos com oxovanádio (IV/V) sobre macrófagos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*;

#### 4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

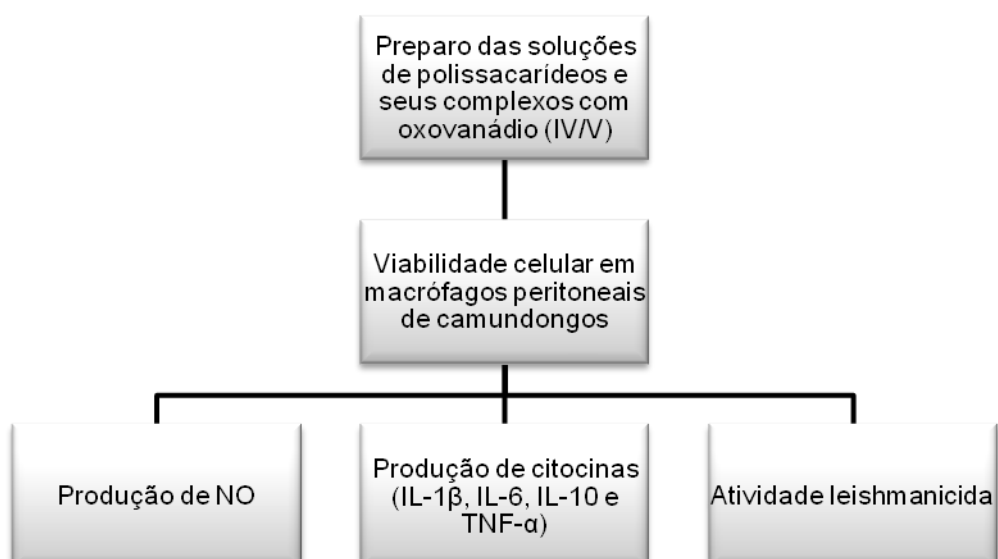


FIGURA 12. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. MATERIAL E REAGENTES

Reagentes adquiridos da Merck do Brasil: Glucose, fosfato monobásico de potássio, fosfato monobásico de sódio, fosfato dibásico de potássio, fosfato dibásico de sódio, sulfato de magnésio heptahidratado, cloreto de potássio, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, dimetilsulfóxido (DMSO).

Reagentes adquiridos da Sigma Chemical Co (St Louis, MO): Brometo de 3-metil[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), ácido N-2-hidroetilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico (HEPES), lipopolissacarídeo (LPS), sulfanilamida, N-naftiletilenodiamino.

Reagentes adquiridos da Cultilab (Campinas, SP): gentamicina, meio Eagle médium (MEM).

Outros reagentes de marcas diversas: Soro fetal bovino (Gibco<sup>®</sup>), ágar bacteriológico (Himedia<sup>®</sup>), peptona bacteriológica (Himedia<sup>®</sup>), extrato de carne (Himedia<sup>®</sup>), Glucantime (Aventis<sup>®</sup>).

Materiais adquiridos da BD<sup>®</sup> (Becton Drive): Seringas de plástico esterilizadas, agulhas 25 x 8 esterilizadas.

Materiais adquiridos da TPP<sup>®</sup> (Techno Plastic Products): placas de culturas multipoços esterilizadas, garrafas de cultura esterilizadas.

Materiais adquiridos da RayBiotech<sup>®</sup>: kits de ELISA para quantificação das citocinas de camundongos (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10).

Os demais reagentes utilizados foram preparações comerciais de pureza analítica adequada. As soluções dos reagentes foram preparadas com água ultrapura em sistema ultrapurificador Gehaka<sup>®</sup>.

### 5.2. POLISSACARÍDEOS COMPLEXADOS COM OXOVANÁDIO

Os seguintes polissacarídeos e seus complexos com oxovanádio (IV/V) foram estudados neste trabalho:

- arabinogalactana (ARAGAL) isolada de *Anadenanthera colubrina* (angico branco) e seu complexo oxovanádio (IV/V) (ARAGAL:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>; para simplificar esta sigla, neste trabalho foi utilizada a sigla do polissacarídeo acompanhada por “VO”: ARAGAL:VO);
- galactomanana (GALMAN-A e GALMAN-B) de *Mimosa scabrella* (bracatinga) e seus respectivos complexos (GALMAN-A:VO e GALMAN-B:VO). A preparação de GALMAN-A incluiu uma etapa de inativação enzimática por fervura em água por 10 min, enquanto que GALMAN-B foi degradada parcialmente pela ação de glicosidases endógenas (NOLETO, 2002);
- xiloglucana (XGJ) de *Hymenaea courbaril* (jatobá) e seu complexo com oxovanádio (IV/V) (XGJ:VO);
- galactomanana do líquen *Ramalina celastri* (GMPOLY) e seu complexo (GMPOLY:VO).

Os polissacarídeos ARAGAL (MORETÃO, 2003; 2004) e XGJ (ROSÁRIO, 2008), GALMAN-A e GALMAN-B foram avaliados neste trabalho quanto à atividade leishmanicida. GMPOLY e seu complexo GMPOLY-VO, que já se mostraram atuar como moduladores das funções de macrófagos e potenciais agentes leishmanicidas (NOLETO, 2002), foram avaliados quanto à produção de citocinas. Os polissacarídeos GALMAN-A, GALMAN-B e XGJ foram cedidos pela Professora Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz. Os polissacarídeos ARAGAL e GMPOLY foram cedidos pelo Professor Marcelo Iacomini. Ambos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

### 5.3. SOLUÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS E SEUS COMPLEXOS

Os complexos foram preparados pela Professora Guilhermina Noletto em colaboração com as Professoras Ana Lucia Ramalho Mercê (Departamento de Química da UFPR) e Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR).

Resumidamente, para obter os complexos em grande quantidade foi utilizada a proporção ligante-metal 2:1, considerando uma unidade de anidrohexitose de acordo com os dados obtidos nos experimentos de titulação potenciométrica. Polissacarídeos liofilizados foram pesados e dissolvidos em água ultrapura, cujo volume foi variável de acordo com a quantidade em miligrama de cada polímero. Após dissolução, foi adicionado o metal na concentração adequada e esta solução foi titulada sob agitação com KOH 0,1 M até pH 7,8. A seguir as soluções de complexos foram dializadas por três dias com troca de água ultrapura em pH 7,8 a cada 12 horas, totalizando 6 trocas. Após a diálise, as soluções foram liofilizadas e os complexos resultantes foram caracterizados por RMN-V<sup>51</sup> e utilizados para os experimentos de atividade biológica.

Para os experimentos de atividade biológica, as soluções estoques dos complexos foram esterilizadas por filtração em membranas de acetato de celulose de 0,22 µm.

### 5.3.1 Dosagem de carboidratos totais

Após filtração foi realizada a dosagem de carboidratos totais. Para determinar a concentração de carboidratos totais das soluções de polissacarídeos e dos complexos de polissacarídeos-oxovanádio foi realizada a dosagem de carboidratos totais pelo método fenol-sulfúrico como descrito por DUBOIS e colaboradores (1956). Esta dosagem baseia-se na formação de derivados furfural e hidroximetilfurfural a partir das pentoses e hexoses, respectivamente, na presença dos reagentes obtendo-se complexo de cor alaranjada. A formação do complexo foi verificada com leitura em espectrofotômetro a 490 nm. Para realização dos cálculos realizou-se uma curva de calibração para cada dosagem, utilizando-se solução padrão do monossacarídeo presente em maior quantidade no respectivo polissacarídeo.

#### 5.4. PROCEDIMENTOS DE CULTIVO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS

As soluções tampões e meios de cultura de células foram preparados de acordo com procedimentos de rotina do Laboratório de Cultivo Celular ou em casos específicos seguindo-se as especificações do fabricante. Modificações eventuais estão descritas no texto.

##### 5.4.1. Meio MEM

O meio mínimo essencial (MEM) (EAGLE, 1959) foi reconstituído em água ultrapura e esterilizado por filtração sob pressão em membrana de acetato de celulose estéril com poro de 0,22 µm. Este meio foi suplementado com HEPES estéril com concentração final de 10 mM, 50 µg/mL de gentamicina e seu pH ajustado para 7,4 com solução estéril de bicarbonato de sódio a 0,1 M. Para o uso em macrófagos peritoneiais de camundongos acrescentou-se 5% de soro fetal bovino (SFB) ao meio. Enquanto que para o uso em *Leishmania (L.) amazonensis* acrescentou-se 10% de soro fetal bovino ao meio de cultura.

##### 5.4.2. Meio Tobbie & Evans

Para cada 100 mL de meio Tobbie & Evans pesou-se 2 g de ágar bacteriológico, 0,3 g de extrato de carne, 0,2 g de peptona bacteriológica e 0,8 g de cloreto de sódio (NaCl). Todos os componentes foram transferidos para um mesmo erlenmeyer e misturados em 100 mL de água destilada. A mistura foi fervida até a completa solubilização. Em seguida, transferiu-se 2 mL para cada tubo de vidro com tampa de rosca. Os tubos foram autoclavados e após seu resfriamento até +/- 50 °C adicionou-se assepticamente 0,2 mL de sangue estéril de coelho (certificado CEEA nº 431) (anexo 1). O sangue foi coletado por punção cardíaca e dispensado em frasco estéril contendo citrato de sódio 10% em capela de fluxo laminar.

### 5.4.3 Cultura de células e procedimentos experimentais relacionados

#### 5.4.3.1 Obtenção de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos

O procedimento de isolamento de macrófagos peritoneais de camundongos foi certificado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Setor de Ciências Biológicas (certificado número nº 431 (anexo 1)).

Camundongos Swiss fêmea com ~2 meses de idade utilizados para o isolamento de macrófagos foram mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sendo alimentados com ração Purina® e água “*ad libitum*”. Os macrófagos peritoneais foram obtidos através da infusão de solução salina tamponada (PBS) estéril a 4 °C na cavidade peritoneal. A suspensão resultante foi centrifugada a 2000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos. A seguir o “pellet” foi resuspenso em meio MEM contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) e 50 µg/mL de gentamicina. Para a realização dos experimentos as células foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^5$  células por poço em placas de 96 poços ou  $1 \times 10^6$  células por poço em placas de 24 poços. Após a incubação por 2 horas, a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>, as células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS a 37 °C (SASADA, 1983, NOLETO, 2002) (Figura 13).

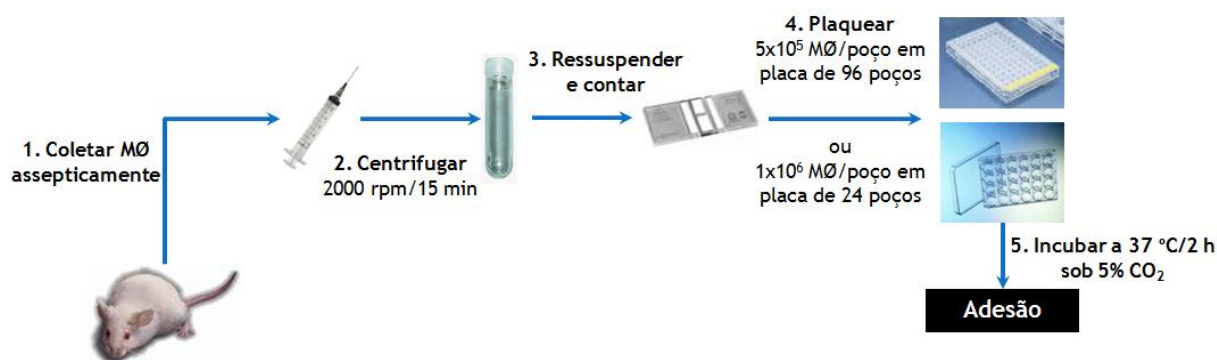


FIGURA 13. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS

Fonte: Adaptada (SASADA, 1983; NOLETO, 2002).

Nota: 1. Os macrófagos peritoneais foram obtidos através da infusão de 10 mL de solução salina tamponada (PBS) estéril a 4 °C na cavidade peritoneal de camundongos Swiss de ~ 2 meses de idade; 2. A suspensão resultante foi centrifugada a 2000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos; 3. A seguir o “pellet” foi ressuspenso em meio MEM contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) e 50 µg/mL de gentamicina; 4. Para a realização dos experimentos as células foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^5$  células por poço em placas de 96 poços ou  $1 \times 10^6$  células por poço em placas de 24 poços; 5. Após a incubação por 2 horas, a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>, as células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS a 37 °C.

#### 5.4.3.2 *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

A cultura de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) foi mantida, logo após o descongelamento, em meio Tobbie & Evans por dois ou três repiques. Depois foi transferida para garrafa estéril de cultivo celular com capacidade para 10 mL contendo MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 µg/mL de gentamicina. Ambos os cultivos foram mantidos em estufa a 24-27 °C.

#### 5.4.3.3 Determinação da viabilidade celular utilizando MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT, como descrito por REILLY e colaboradores (1998). Este teste foi realizado a fim de se determinar as concentrações adequadas dos polissacarídeos e dos complexos polissacarídeos-oxovanádio para os experimentos posteriores. O MTT, brometo de (3-metil-[4-5-



dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio, é reduzido em células viáveis pela ação de desidrogenases. Nesta reação é formado cristal de formazan, um produto de cor roxa solúvel em DMSO, que permite a leitura de absorbância em 550 nm.

Os macrófagos foram plaqueados a  $5 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços. Após a adesão, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se meio de cultura contendo diferentes concentrações dos polissacarídeos e dos complexos polissacarídeos-oxovanádio. Após 48 horas de incubação, o meio foi retirado e adicionou-se 180  $\mu$ L de HBSS e 20  $\mu$ L de solução de MTT 5 mg/mL e incubou-se a 37 °C sob 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por 3 horas. Após, removeu-se o sobrenadante e o cristal de formazan formado foi dissolvido em DMSO. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (TECAN INFINITE M200) a 550 nm (Figura 14).

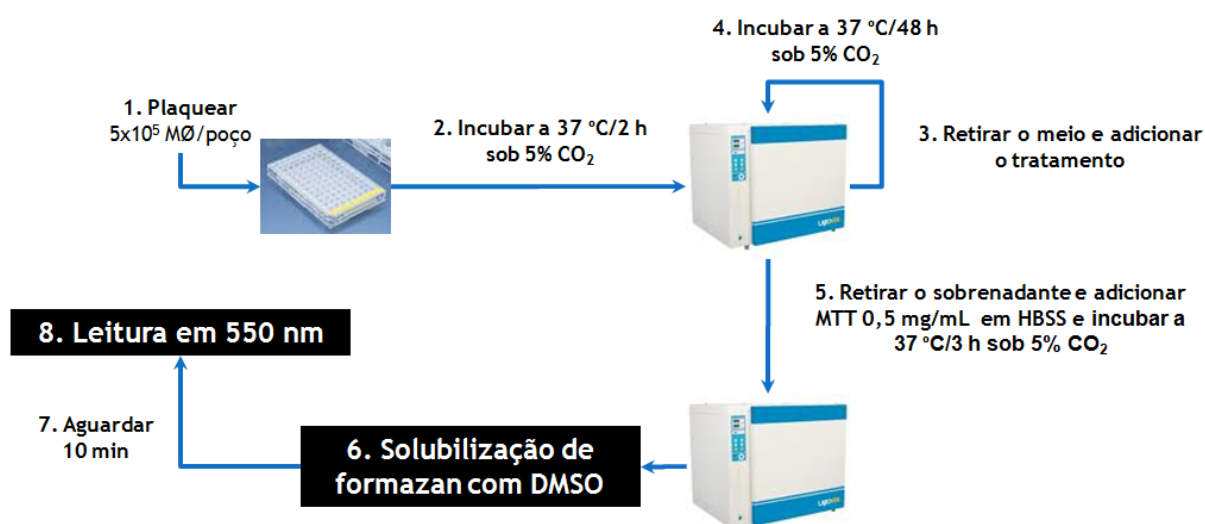


FIGURA 14. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO MTT

Fonte: Adaptada (REILLY, 1998).

Nota: **1.** Os macrófagos foram plaqueados a  $5 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços; **2.** Permitiu-se a adesão a 37 °C sob 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por 2 horas; **3.** O meio de cultura foi retirado e adicionou-se meio de cultura contendo diferentes concentrações dos polissacarídeos e dos complexos polissacarídeos-oxovanádio; **4.** Permitiu-se o tratamento a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas; **5.** Em seguida o meio foi retirado e adicionou-se 180  $\mu$ L de HBSS e 20  $\mu$ L de solução de MTT 5 mg/mL e incubou-se a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas; **6.** Após, removeu-se o sobrenadante e o cristal de formazan formado foi dissolvido em DMSO; **7.** Aguardou-se 10 minutos para a total solubilização dos cristais de formazan; **8.** A leitura foi realizada em leitor de microplaca a 550 nm.

#### 5.4.3.4 Avaliação do efeito dos compostos na produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada pela dosagem de seus produtos de degradação, nitrito e nitrato, utilizando-se o reagente de Griess. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser analisado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm (Figura 15).

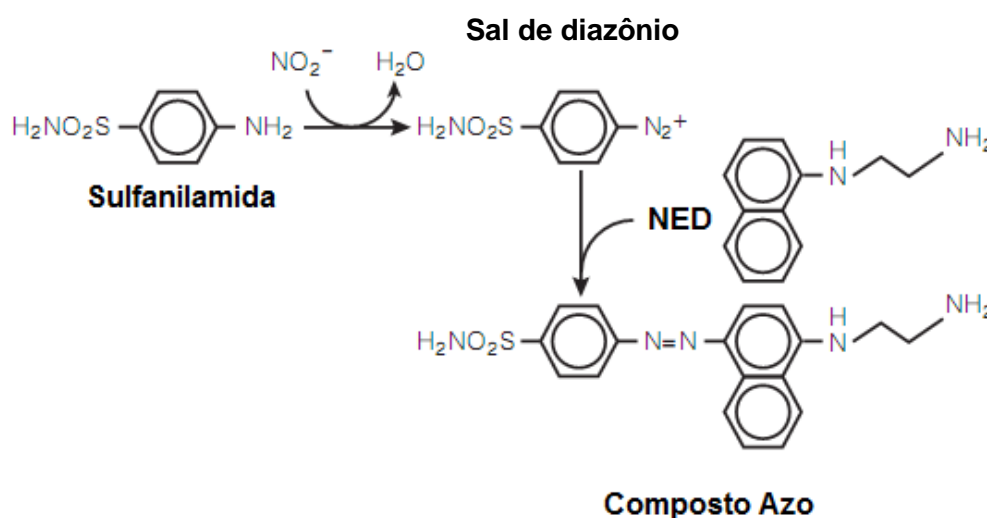


FIGURA 15. REAÇÃO DE  $\text{NO}_2^-$  COM O REAGENTE DE GRIESS

Fonte: Adaptada (PROMEGA. "Technical Bulletin – Griess Reagent System: instruction for use of product" G2930. Disponível em: [www.promega.com/tbs](http://www.promega.com/tbs). Acesso em: 16 dez. 2009).

Os macrófagos peritoneais foram plaqueados em placa de 96 poços a  $5 \times 10^5$  células/poço. Após a adesão, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se meio de cultura contendo diferentes concentrações dos polissacarídeos e dos complexos polissacarídeos-oxovanádio. Após 48 horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$  sob 5%  $\text{CO}_2$ , misturou-se o sobrenadante na proporção 1:1 com reagente de Griess. Este reagente foi preparado pela mistura de duas soluções na proporção 1:1,

imediatamente antes do uso. A primeira solução era constituída por N-naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e a outra solução por sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v). Após reagir por 10 minutos, realizou-se a leitura em leitor de microplaca a 550 nm (GREEN, 1982) (Figura 16). Como controle positivo para a produção de óxido nítrico utilizou-se LPS (50 ng/mL).

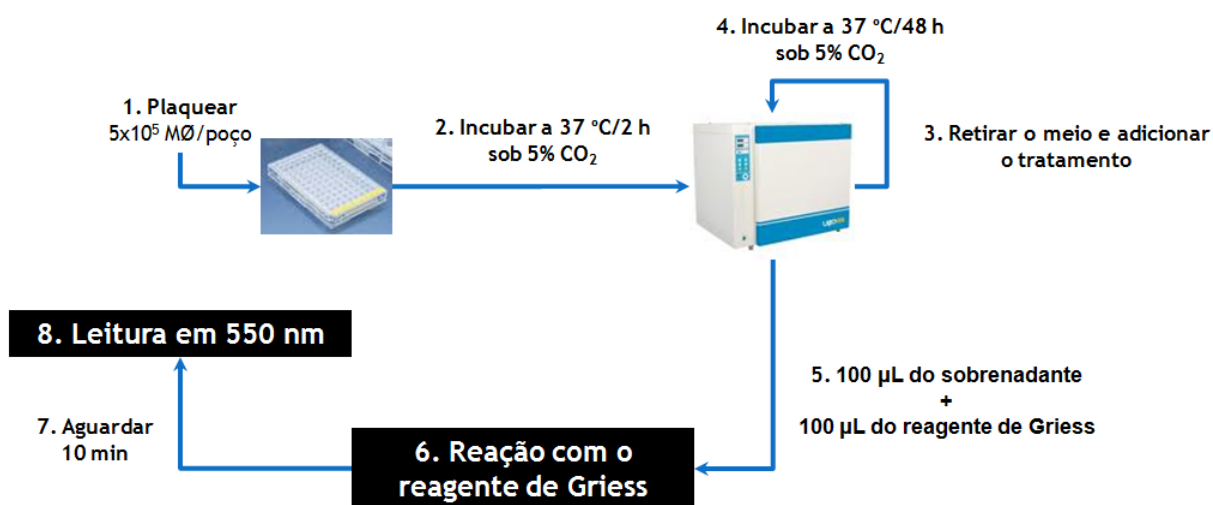


FIGURA 16. AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Fonte: Adaptada (GREEN, 1982).

Nota: **1.** Os macrófagos foram plaqueados a  $5 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços; **2.** Permitiu-se a adesão a 37 °C sob 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por 2 horas; **3.** O meio de cultura foi retirado e adicionou-se meio de cultura contendo diferentes concentrações dos polissacarídeos e dos complexos polissacarídeos-oxovanádio; **4.** Permitiu-se o tratamento a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas; **5.** Em seguida 100 µL do sobrenadante foi utilizado para reagir com 100 µL do reagente de Griess; **6. e 7.** Aguardou-se 10 minutos para a estabilização da formação do produto (composto azo); **8.** A leitura foi realizada em leitor de microplaca a 550 nm.

#### 5.4.3.5 Avaliação do efeito dos compostos sobre a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-10

Para a quantificação das citocinas foi utilizado o ensaio de enzima ligada ao imunoabsorvente (ELISA) de captura (Figura 17).

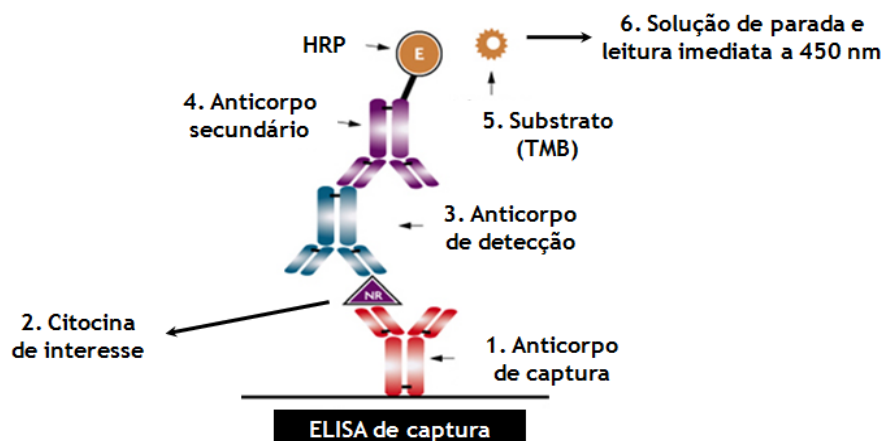


FIGURA 17. ELISA DE CAPTURA

Fonte: Adaptada (ACTIVE MOTIF. Disponível em: [http://www.activemotif.com/images/products/nr\\_sandwich.jpg](http://www.activemotif.com/images/products/nr_sandwich.jpg). Acesso em: 25 fev. 2011).

Nota: 1. No fundo do poço da placa de ensaio de enzima ligada ao imunoabsorvente (ELISA) há anticorpo aderido; 2. Esse anticorpo reconhece especificamente a citocina de interesse; 3. Adiciona-se um anticorpo de detecção que se liga a citocina capturada; 4. O anticorpo de detecção é então ligado por um anticorpo secundário conjugado com peroxidase de raiz forte ("horseradish peroxidase", HRP); 5. Essa peroxidase atua sobre o substrato tetrametilbenzidina (TMB); 6. Em seguida, adiciona-se a solução de parada (ácido sulfúrico 2 M) e realiza-se a leitura imediatamente em leitor de microplaca a 450 nm.

Para a avaliação da produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, estas células foram plaqueadas a uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/poço em placas de 24 poços. Após a adesão, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se meio de cultura contendo diferentes concentrações dos polissacarídeos e dos complexos polissacarídeos-oxovanádio. Após 48 horas de incubação a 37 °C sob 5% CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi removido, centrifugado e a concentração de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  no sobrenadante foi determinada por ensaio de enzima ligada ao imunoabsorvente (ELISA), segundo as especificações do fabricante (RayBiotech®) (Figura 18). Como controle positivo para a produção de citocinas utilizou-se LPS (50 ng/mL).

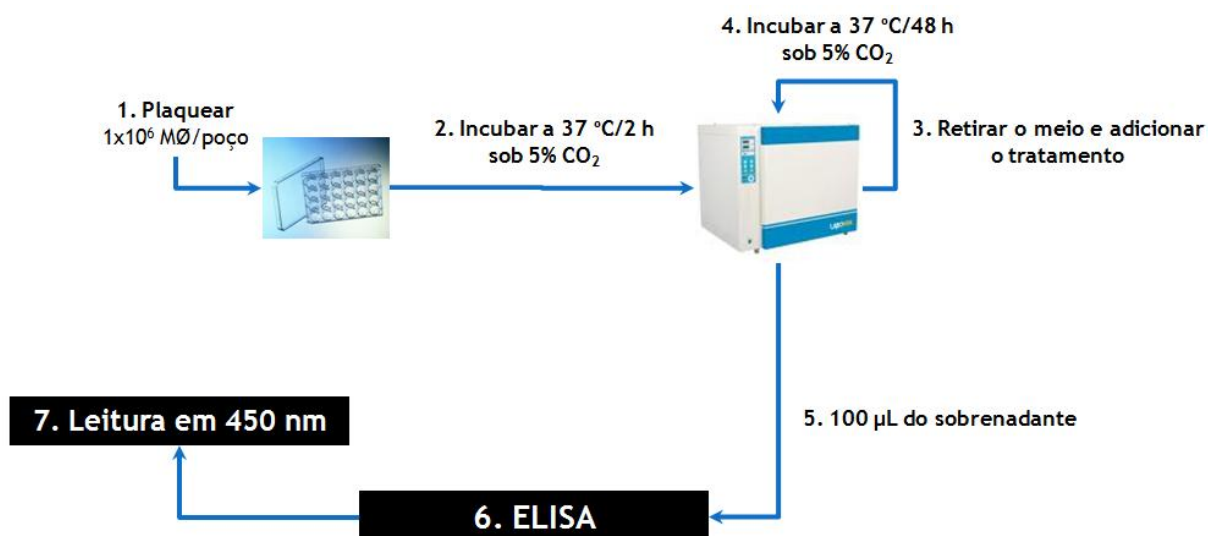


FIGURA 18. AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10

Nota: 1. Os macrófagos foram plaqueados a  $1 \times 10^6$  células/poço em placas de 24 poços; 2. Permitiu-se a adesão a 37 °C sob 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por 2 horas; 3. O meio de cultura foi retirado e adicionou-se meio de cultura contendo diferentes concentrações dos polissacarídeos e dos complexos polissacarídeos-oxovanádio; 4. Permitiu-se o tratamento a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas; 5. e 6. Em seguida 100  $\mu$ L do sobrenadante foi utilizado para o ensaio de enzima ligada ao imunoabsorvente (ELISA), segundo as especificações do fabricante (RayBiotech®); 7. A leitura foi realizada em leitor de microplaca a 450 nm.

#### 5.4.3.6 Avaliação da atividade leishmanicida sobre a forma amastigota intracelular em macrófagos

Para avaliação do efeito leishmanicida sobre a forma amastigota intracelular, macrófagos foram plaqueados a uma densidade de  $5 \times 10^5$  células por poço em placas de 24 poços. Após adesão, as células não aderentes foram removidas e adicionou-se *Leishmania (L.) amazonensis* na proporção de cinco parasitas por macrófago, permitindo-se a infecção por 12 horas a 34 °C sob 5% CO<sub>2</sub> (CHANG, 1986). Após esse tempo, o sobrenadante foi removido e os macrófagos infectados foram lavados duas vezes com PBS a 37 °C. Em seguida, adicionou-se meio de cultura contendo diferentes concentrações dos polissacarídeos e dos complexos polissacarídeos-oxovanádio. Após 48 horas de incubação a 37 °C sob 5% CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 0,4 mL de soro fisiológico. As células

foram, então, raspadas e transferidas para meio Tobbie & Evans e incubadas por 5 a 10 dias a 24-27 °C. O experimento foi avaliado por contagem das formas promastigotas utilizando-se hemocitômetro de Neubauer e o resultado expresso em número de *Leishmania*/mL (Figura 19). Como controle positivo para a atividade leishmanicida utilizou-se Glucantime® (300 µg/mL).

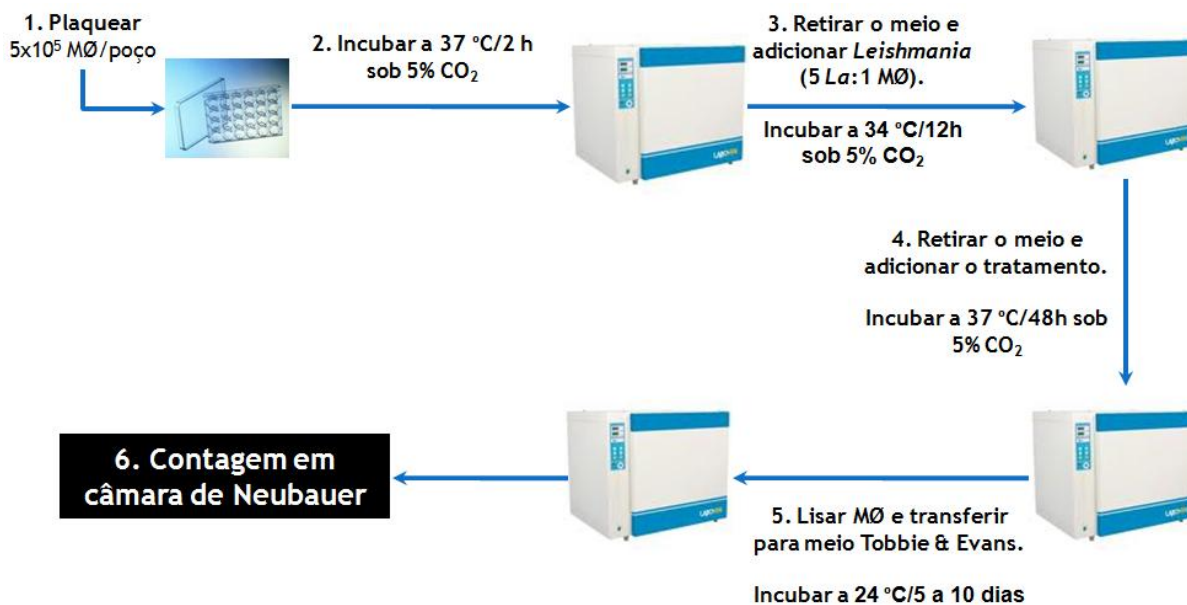


FIGURA 19. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA SOBRE A FORMA AMASTIGOTA INTRACELULAR EM MACRÓFAGOS

Fonte: Adaptada (CHANG, 1986).

Nota: 1. Os macrófagos foram plaqueados a  $5 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços; 2. Permitiu-se a adesão a 37 °C sob 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por 2 horas; 3. O meio de cultura foi retirado e adicionou-se *Leishmania (L.) amazonensis* (La) na proporção de 5 parasitos para cada macrófago (5 La: 1 MØ) permitindo-se infecção a 34 °C sob 5% de CO<sub>2</sub> por 12 horas; 4. Em seguida, o meio foi retirado, os parasitos que não foram fagocitados foram removidos por lavagem com PBS a 37 °C e adicionou-se meio de cultura contendo diferentes concentrações dos polissacarídeos e dos complexos polissacarídeos-oxovanádio permitindo-se o tratamento a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas; 5. Após, removeu-se o sobrenadante, adicionou-se 400 µL de soro fisiológico estéril e os MØ foram lisados. Essa solução foi transferida para meio de cultura Tobbie & Evans incubando-se a 24 °C por 5 a 10 dias; 6. Em seguida, o experimento foi avaliado por contagem em hemocitômetro de Neubauer e o resultado expresso em número de *Leishmania*/mL.

## 5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas análises de variância ANOVA (fator duplo) seguidas por teste de Tukey. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (média  $\pm$  DP). Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de  $P \leq 0,05$ .

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS E SEUS COMPLEXOS COM OXOVANÁDIO (IV/V) EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

#### 6.1.1 Efeitos sobre a viabilidade celular

Os polissacarídeos e seus complexos com oxovanádio (IV/V) foram avaliados quanto a citotoxicidade, com a finalidade de estabelecer as concentrações ideais de tratamento das células com as moléculas, sem afetar a viabilidade das mesmas. Para a determinação da citotoxicidade os macrófagos peritoneais foram tratadas com diferentes concentrações de ARAGAL:VO, GMPOLY:VO e XGJ:VO em 48 horas (Figura 20).

A figura 20 mostra que o complexo ARAGAL:VO na concentração de 10 µg/mL aumentou a viabilidade celular em 27%, enquanto que nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL diminuiu significativamente a viabilidade celular em 34%, 94% e 98%, respectivamente. Com este resultado, a maior concentração utilizada para este complexo nos experimentos posteriores foi 10 µg/mL (exceto para o experimento de NO que utilizou-se 25 µg/mL como a maior concentração, pois este experimento foi realizado no mesmo plaqueamento para avaliação dos efeitos sobre a viabilidade celular). Para efeito de comparação entre o polímero nativo e o complexado utilizou-se ARAGAL na mesma concentração. Nesta concentração (10 µg/mL), ARAGAL não altera a viabilidade celular de macrófagos em 48 h de tratamento (KANGUSSU-MARCOLINO, 2010).

Ainda na figura 20, pode-se observar que o complexo GMPOLY:VO em 48 horas mostrou-se citotóxico em concentrações a partir de 50 µg/mL causando aproximadamente 78% de perda de viabilidade com 100 µg/mL. Dessa forma, as concentrações utilizadas para os demais experimentos foram 5 µg/mL, 10 µg/mL e 25 µg/mL de GMPOLY:VO e 25 µg/mL de GMPOLY. Nesta concentração GMPOLY não teve efeito citotóxico para macrófagos peritoneais de camundongos (NOLETO, 2002).

Em estudos anteriores realizados por Noletto e colaboradores (2002), a preparação do complexo GMPOLY-VO apresentou maior citotoxicidade que a



preparação utilizada no presente estudo. Naquela preparação a solução do complexo foi precipitada com etanol e não dializada. Sugere-se que essa preparação contivesse excesso de metal não ligado o que poderia ter contribuído para a alta citotoxicidade observada para essa preparação de GMPOLY-VO nas concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL que diminuíram a viabilidade celular em ~35% e 80%, respectivamente. O processo de diálise empregado para a preparação do complexo GMPOLY:VO utilizada no presente estudo retirou o excesso de metal não ligado, obtendo-se somente metal complexado com o polissacarídeo GMPOLY e, provavelmente este procedimento pode ter contribuído para a menor citotoxicidade.

O complexo da xiloglucana de jatobá apresentou menor efeito na viabilidade celular quando comparado com os demais. Pode-se observar na figura 20 que em 48 horas de incubação o complexo XGJ:VO nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL diminuiu significativamente a viabilidade celular em 18% e 49%, respectivamente. XGJ foi anteriormente avaliada em relação a seus efeitos sobre a viabilidade celular em macrófagos peritoneais de camundongos tratados por 48 horas. Neste foi observado uma diminuição de aproximadamente 20% no tratamento com 100 µg/mL (ROSÁRIO, 2008). Dessa forma, as concentrações utilizadas para os demais experimentos foram 5 µg/mL, 10 µg/mL e 25 µg/mL para XGJ:VO e 25 µg/mL para XGJ.

Em 48 horas de incubação, as concentrações variaram de 50 a 250 µg/mL para GALMAN-A e GALMAN-B e para GALMAN-A:VO e GALMAN-B:VO de 1 µg/mL a 25 µg/mL. Entre os polissacarídeos não complexados somente GALMAN-B exibiu toxicidade a partir de 100 µg/mL, enquanto dentre os complexos, apenas GALMAN-A:VO reduziu a viabilidade em ~15% na concentração de 25 µg/mL, em relação ao controle (ADRIAZOLA, 2008). Dessa forma, as concentrações utilizadas para os experimentos de atividade leishmanicida e dosagem de citocinas foram 5 µg/mL, 10 µg/mL e 25 µg/mL para GALMAN-A:VO e GALMAN-B:VO, e 25 µg/mL para GALMAN-A e GALMAN-B.

GMPOLY 500 µg/mL e XGJ 50 µg/mL não alteraram significativamente a viabilidade de macrófagos em 48 horas de tratamento (NOLETO, 2002; ROSÁRIO, 2008). Entretanto, observou-se no presente trabalho que GMPOLY:VO e XGJ:VO reduziram a viabilidade celular em 34% e 18%, respectivamente. Dessa forma, os

resultados de viabilidade celular mostram que os complexos foram potencialmente mais tóxicos para os macrófagos que os polímeros não complexados e sugerem que a presença do metal pode ser crucial para intensificar ou modificar os efeitos biológicos dos polisacarídeos.

Posteriormente a avaliação da viabilidade celular, foram avaliados os efeitos dos polímeros sobre a produção de NO, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais de camundongos.

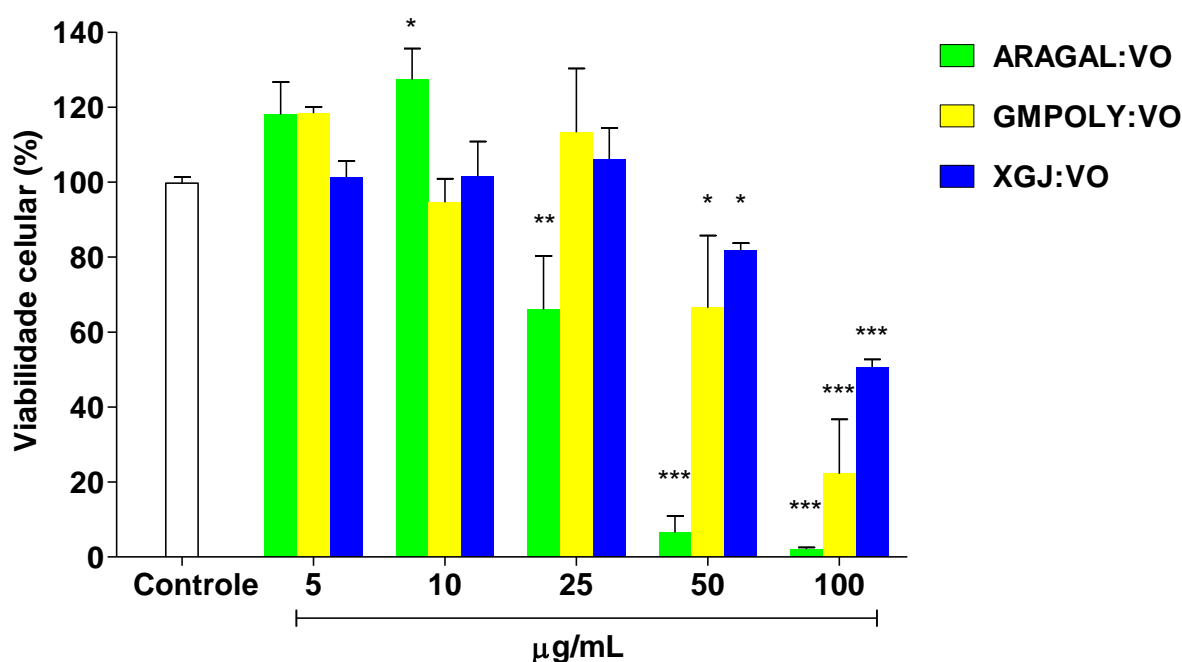


FIGURA 20. VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ARAGAL:VO, GMPOLY:VO E XGJ:VO POR 48 HORAS

Nota: Resultados obtidos para viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos sob efeito de ARAGAL:VO, GMPOLY:VO e XGJ:VO nas concentrações de 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. Após 48 horas na presença dos polissacarídeos a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>, o meio de reação foi retirado e foi adicionou-se MTT (0,5 mg/mL) em HBSS seguindo-se incubação por mais 3 horas a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Após 3 horas, o MTT foi removido e adicionou-se DMSO. A absorbância foi medida em 550 nm. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP (n = 3, sendo cada experimento em triplicata). \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001 em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura).

### 6.1.2 Efeitos dos complexos ARAGAL:VO, GMPOLY:VO e XGJ:VO sobre a produção de óxido nítrico

Os macrófagos produzem diferentes níveis de NO em resposta a estimulação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A ativação da eNOS em macrófagos não ativados é necessária para ativar a iNOS induzida por LPS em macrófagos ativados. A quantidade de NO produzido por macrófagos ativados depende da maneira pela qual eles são estimulados (THOMAS, 2008).

No presente trabalho, observa-se que ARAGAL:VO nas concentrações de 5 µg/mL a 25 µg/mL não altera significativamente a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos (Figura 21). Moretão e colaboradores (2003) não observaram qualquer efeito na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com 200 mg/kg de ARAGAL e, além disso, esse polissacarídeo também não interferiu na produção de óxido nítrico após exposição *in vitro* de macrófagos de animais não tratados.

A preparação de GMPOLY:VO utilizada no presente trabalho não mostrou efeito sobre a produção de óxido nítrico nas concentrações de 5 a 25 µg/mL, como demonstrado na figura 21. No estudo realizado por Noletto e colaboradores (NOLETO, 2002), o complexo GMPOLY-VO em concentrações de até 1 µg/mL também não exibiu efeito estimulatório nesta via. Por outro lado, o polímero não complexado (GMPOLY) nas concentrações de 10 µg/mL a 250 µg/mL estimulou a produção de NO em aproximadamente 40%.

XGJ:VO nas concentrações de 5 µg/mL a 25 µg/mL também não interferiu na via de produção de óxido nítrico (Figura 21). Por outro lado, Rosário e colaboradores (2008) observaram um aumento de 68% na produção de NO em macrófagos tratados com 25 µg/mL de XGJ. Dessa forma, sugere-se que a complexação de XGJ com oxovanádio (IV/V) pode diminuir a capacidade de XGJ de estimular a produção de NO por macrófagos.

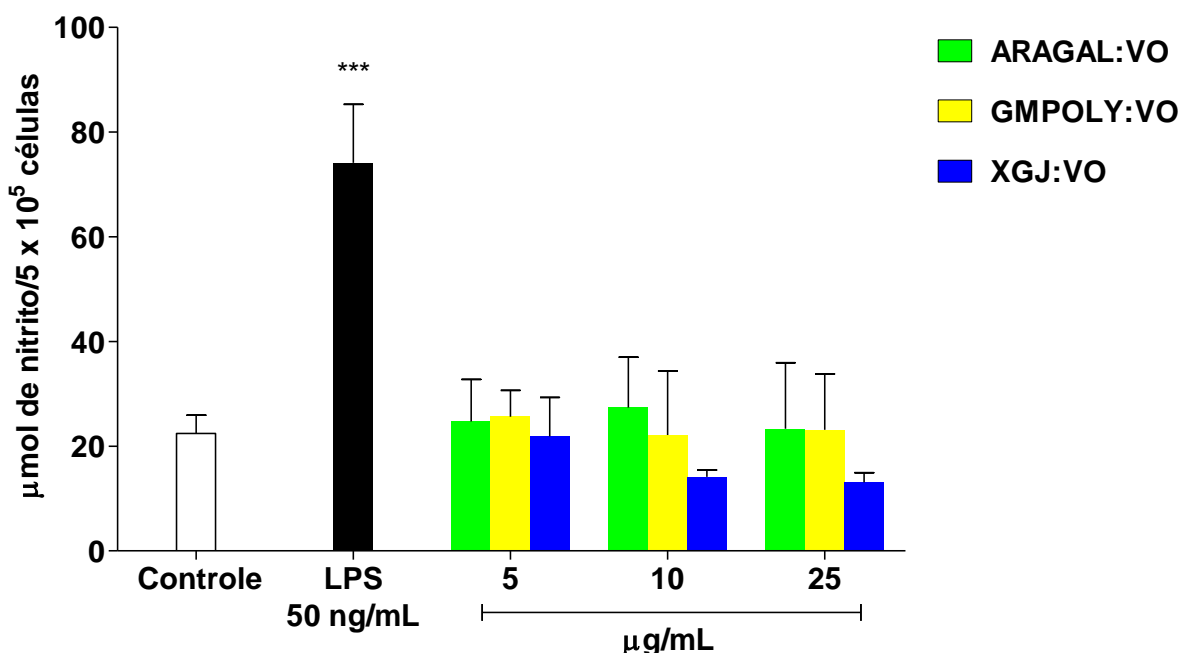


FIGURA 21. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ARAGAL:VO, GMPOLY:VO E XGJ:VO POR 48 HORAS

Nota: Resultados obtidos para produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos sob efeito de ARAGAL:VO, GMPOLY:VO e XGJ:VO nas concentrações de 5 μg/mL, 10 μg/mL e 25 μg/mL. Após 48 horas na presença dos polímeros a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>, misturou-se 100 μL do meio de reação com 100 μL do reagente de Griess. Após reagir por 10 minutos, realizou-se a leitura em leitor de microplaca a 550 nm. Como controle positivo para a produção de óxido nítrico utilizou-se LPS (50 ng/mL). Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 3, sendo cada experimento em triplicata). \*\*\* P < 0,001 em comparação com o controle.

Diferentes respostas tem sido observadas para polissacarídeos, assim como para compostos de vanádio, em relação a ativação de macrófagos para a produção de óxido nítrico e citocinas. A partir de um polissacarídeo extraído de sementes de *Leucaena leucocephala* foi preparado um derivado C-glicosídico 2-propanol (PE) que inibiu a produção de óxido nítrico e a secreção de TNF-α por macrófagos RAW-264.7 estimulados com LPS, indicando que PE pode atuar como potente anti-inflamatório (GAMAL-ELDEEN, 2007). Embora não tenha sido determinado o efeito dos complexos ARAGAL:VO, GMPOLY:VO e XGJ:VO sobre a produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com LPS, observa-se que modificações estruturais nos polímeros podem alterar o efeito biológico do polissacarídeo quanto a produção de NO.

Uma manana complexada com vanádio (MPOLY-VO) na concentração de 1 µg/mL não alterou significativamente a produção de óxido nítrico por macrófagos, enquanto que a forma não complexada desse polissacarídeo na concentração de 10 µg/mL foi capaz de aumentar a produção de NO em aproximadamente 55% (NOLETO, 2004). Esse resultado mostra-se semelhante ao observado para XGJ (ROSÁRIO, 2008) e XGJ:VO, para os quais a forma não complexada estimulou a produção de NO enquanto que o complexo não a alterou. Entretanto, vanádio complexado com aspirina (VOAsp) na concentração de 0,5 µM aumentou a produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 tratados por um período de 24 horas em aproximadamente 50%, em relação ao controle. A indução da geração de NO foi devida ao aumento de 40% e 30% na expressão de eNOS e iNOS, respectivamente (MOLINUEVO; ETCHEVERRY; CORTIZO, 2005). Esses resultados sugerem que a resposta celular ao vanádio pode ser dependente do ligante do metal.

#### 6.1.3 Efeitos dos polissacarídeos e seus complexos sobre a produção de interleucina-1β

A interleucina-1β é produzida principalmente por monócitos e macrófagos quando estimulados, tendo o LPS como principal agente indutor da ativação desta via nestas células. A estimulação por LPS ocorre através de sua ligação aos receptores Toll-like (TLRs) na superfície de macrófagos, resultando na indução da transcrição e tradução de IL-1β (GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010).

Tanto ARAGAL quanto ARAGAL:VO na concentração de 10 µg/mL aumentaram significativamente a produção de IL-1β em 366% e 562%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 22), mas não houve diferença entre o polímero nativo e o complexado.

GMPLY na concentração de 25 µg/mL aumentou significativamente a produção de IL-1β em 665%, em relação ao controle. GMPLY:VO nas concentrações de 5 µg/mL, 10 µg/mL e 25 µg/mL também aumentou a produção de IL-1β em 455%, 628% e 1054%, respectivamente, em relação ao controle. GMPLY:VO na concentração de 25 µg/mL aumentou a produção de IL-1β em 389% em relação a GMPLY na mesma concentração. A complexação pode ter

promovido uma alteração conformacional no polímero tornando-o mais potente ativador, desta via ou ainda uma possível participação do vanádio nesta ativação (Figura 22).

Na figura 22 estão representados os resultados da produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos na presença de XGJ e XGJ:VO em 48 horas. Na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ , XGJ e XGJ:VO aumentaram a produção dessa interleucina em 409% e 523%, respectivamente, em relação ao controle. Neste estudo o aumento na produção desta interleucina foi 5 vezes maior que o observado por Rosário e colaboradores (2011), no qual a avaliação foi realizada em 24 horas de tratamento e XGJ promoveu um aumento de 90% e 577% nas concentrações de 25  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

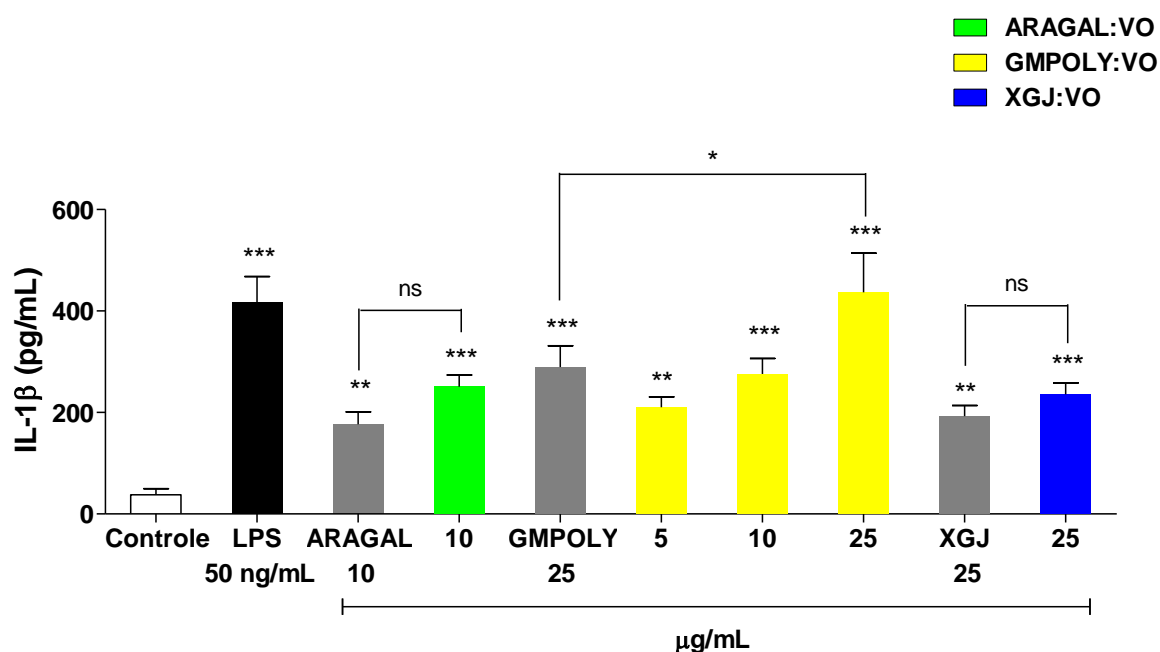


FIGURA 22. PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-1 $\beta$  POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ARAGAL, ARAGAL:VO, GMPOLY, GMPOLY:VO, XGJ E XGJ:VO POR 48 HORAS

Nota: Resultados obtidos para produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos peritoneais de camundongos sob efeito de ARAGAL 10  $\mu\text{g/mL}$ , ARAGAL:VO 10  $\mu\text{g/mL}$ , GMPOLY 25  $\mu\text{g/mL}$ , GMPOLY:VO 5, 10 e 25  $\mu\text{g/mL}$ , XGJ 25  $\mu\text{g/mL}$  e XGJ:VO 25  $\mu\text{g/mL}$ . Após 48 horas na presença dos polímeros a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>, utilizou-se 100  $\mu\text{L}$  do meio de reação para a quantificação de IL-1 $\beta$  por ELISA, segundo as especificações do fabricante. Como controle positivo para a produção de IL-1 $\beta$  utilizou-se LPS (50 ng/mL). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP (n = 3, sendo cada experimento em triplicata). \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 e ns = não significativo.

As preparações de galactomananas GALMAN-A e GALMAN-B e seus complexos com vanádio promoveram um expressivo aumento na produção de IL-1 $\beta$  como demonstrado na figura 23. GALMAN-A na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  aumentou significativamente a produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos peritoneais em 448%, em relação ao controle, enquanto que seu complexo com oxovanádio (IV/V) (GALMAN-A:VO) nas concentrações de 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  e 25  $\mu\text{g/mL}$  a aumentou em 537%, 727% e 693%, respectivamente. Para GALMAN-B na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  o aumento na produção de IL-1 $\beta$  foi de 815%, em relação ao controle. Enquanto que GALMAN-B:VO nas concentrações de 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  e 25  $\mu\text{g/mL}$  aumentou em 566%, 508% e 651%, respectivamente a produção de IL-1 $\beta$  (Figura 23). GALMAN-B promoveu um aumento de aproximadamente 2 vezes na produção de IL-1 $\beta$  quando comparado com GALMAN-A na mesma concentração (25  $\mu\text{g/mL}$ ), enquanto que os níveis de IL-1 $\beta$  produzidas por macrófagos após o tratamento com as preparações de galactomananas (-A e -B) complexadas com oxovanádio (IV/V) foram equivalentes.

O efeito de polissacarídeos em macrófagos é em parte, atribuída a características estruturais e conformação do polímero que podem facilitar ou não sua interação com receptores na superfície destas células, que resultará na modulação da função de macrófagos (SILVA, 2009). Neste sentido, a diferença de estímulo observado entre GALMAN-A e GALMAN-B na produção de IL-1 $\beta$  pode ser atribuída à alteração da estrutura nativa da galactomanana. GALMAN-A foi protegida da ação de glicosidases durante o processo de isolamento, enquanto que GALMAN-B foi isolada de forma a permitir uma degradação parcial do polímero. Dessa forma são duas preparações do mesmo polímero com características conformacionais distintas. O produto da degradação parcial do polímero (GALMAN-B) pode ter favorecido uma conformação tal, que contribuiu para uma maior interação com receptores na superfície de macrófagos, culminando em maior ativação destas células.

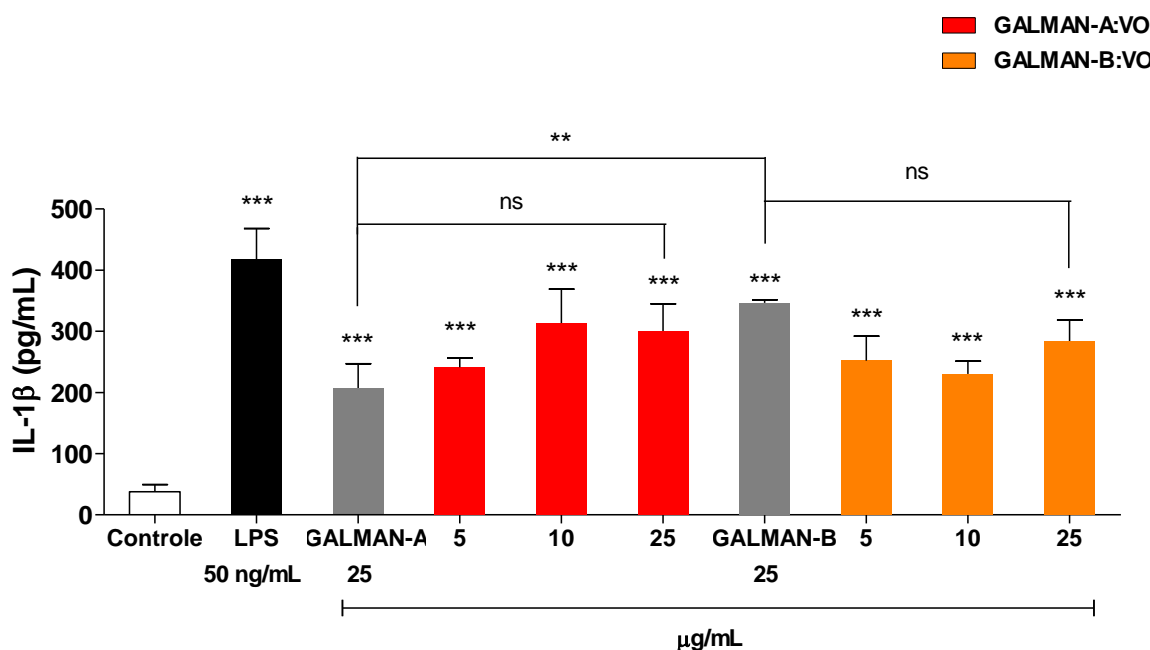


FIGURA 23. PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-1 $\beta$  POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM GALMAN-A, GALMAN-A:VO, GALMAN-B E GALMAN-B:VO POR 48 HORAS

Nota: Resultados obtidos para produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos peritoneais de camundongos sob efeito de GALMAN-A 25  $\mu$ g/mL, GALMAN-A:VO 5, 10 e 25  $\mu$ g/mL, GALMAN-B 25  $\mu$ g/mL e GALMAN-B:VO 5, 10 e 25  $\mu$ g/mL. Após 48 horas na presença dos polímeros a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>, utilizou-se 100  $\mu$ L do meio de reação para a quantificação de IL-1 $\beta$  por ELISA, segundo as especificações do fabricante. Como controle positivo para a produção de IL-1 $\beta$  utilizou-se LPS (50 ng/mL). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP (n = 3, sendo cada experimento em triplicata). \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 e ns = não significativo.

Diferentes respostas têm sido observadas para outros polissacarídeos em relação à produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos peritoneais de camundongos. Uma arabinogalactana de “larch wood” e fucoidana da alga marinha *Fucus vesiculosus* não alteraram significativamente a produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com 10  $\mu$ g/mL a 100  $\mu$ g/mL por 48 horas (CHOI, 2005). Por outro lado, um polissacarídeo extraído de raízes de *Glycyrrhiza uralensis* Fish, composto por uma cadeia principal de resíduos de D-galactose  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)-ligados, aumentou a produção de IL-1 por macrófagos de maneira tempo-dose-dependente. Na dose de 10  $\mu$ g/mL aumentou em aproximadamente 200%, em relação ao controle, alcançando um máximo de 500% na dose de 400  $\mu$ g/mL (CHENG, 2008). GMPOLY na concentração de 25  $\mu$ g/mL aumentou a produção de IL-1 $\beta$  em 665%,



enquanto que GMPOLY:VO na concentração de 10 µg/mL, concentração 40 vezes menor em relação ao polissacarídeo de *Glycyrrhiza uralensis* Fish, aumentou a produção de IL-1β em 628%. Esses resultados sugerem que a resposta do macrófago aos diferentes polissacarídeos depende de características estruturais inerentes aos polímeros, pois se observa efeitos biológicos diferentes mesmo para uma mesma classe de polissacarídeos, como para arabinogalactanas.

Além disso, para compostos de vanádio também tem sido observado aumento na produção de interleucinas. Perovovanádio (pV), bisperoxovanádio 1,10-fenantrolina (bpV(phen)) injetado via intraperitoneal na concentração de 2,5 µmol/30 g de peso corporal em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major* aumentou a produção de IL-1β e IL-6 em aproximadamente 83% e 600%, respectivamente (MATTE, 2000). Dessa forma, sugere-se que o metal vanádio pode reforçar a produção de IL-1β, como observado para GMPOLY e GMPOLY:VO. Foi necessária uma concentração menor de GMPOLY:VO (10 µg/mL) para exercer efeito equivalente na produção de IL-1β por GMPOLY (25 µg/mL).

#### 6.1.4 Efeitos dos polissacarídeos e seus complexos sobre a produção de interleucina-6

A produção de IL-6 foi detectada em muitos tipos de células, entretanto, as fontes primárias são monócitos e macrófagos nos locais de inflamação durante a fase aguda da inflamação. A produção de IL-6 por monócitos depende de diversos fatores de transcrição, principalmente NF-κB, C-EPBβ (NF-IL-6) e AP1. Os estímulos que desencadeiam a ativação desses fatores de transcrição incluem TNF-α e IL-1, assim como produtos bacterianos, tais como LPS (NAUGLER; KARIN, 2008).

ARAGAL e ARAGAL:VO na concentração de 10 µg/mL aumentaram significativamente a produção de IL-6 em 249% e 539%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 24). Observa-se também que há diferença significativa entre ARAGAL e ARAGAL:VO, onde ARAGAL:VO aumenta a produção de IL-6 em 290% em relação a ARAGAL na mesma concentração. Similar comportamento foi observado para a galactomanna (GMPOLY) e seu complexo, com observado na figura 24. Estes resultados sugerem que a complexação dos polímeros pode ter favorecido uma conformação que possibilitou uma maior ativação desta via.

GMPLY na concentração de 25 µg/mL aumentou a produção de IL-6 em 296%, enquanto que GMPLY:VO na mesma concentração aumentou em 794%. A diferença entre as formas complexada e não complexada foi de 498% indicando, assim como para ARAGAL e ARAGAL:VO, uma possível alteração conformacional após a complexação ou uma participação do vanádio na ativação da via de produção de IL-6 (MATTE, 2000; ALBAN, 2001) (Figura 24).

O tratamento de macrófagos peritoneais de camundongos com XGJ na concentração de 25 µg/mL por 48 horas aumentou a produção de IL-6 em 234%, em relação ao controle. De forma semelhante, XGJ:VO na mesma concentração promoveu um aumento de 202% como pode ser observado na figura 24. Não havendo diferença entre a forma não complexada e seu complexo com oxovanádio. O efeito de XGJ observado no presente estudo foi mais intenso do que aqueles observados anteriormente por Rosário e colaboradores (2011), no qual a produção de IL-6 por macrófagos peritoneais tratados por 24 horas promoveu um aumento de 45% na concentração de 50 µg/mL, em relação ao controle. Dessa forma, um período de tratamento mais longo pode ter resultado em uma maior produção de IL-6 por macrófagos peritoneais.

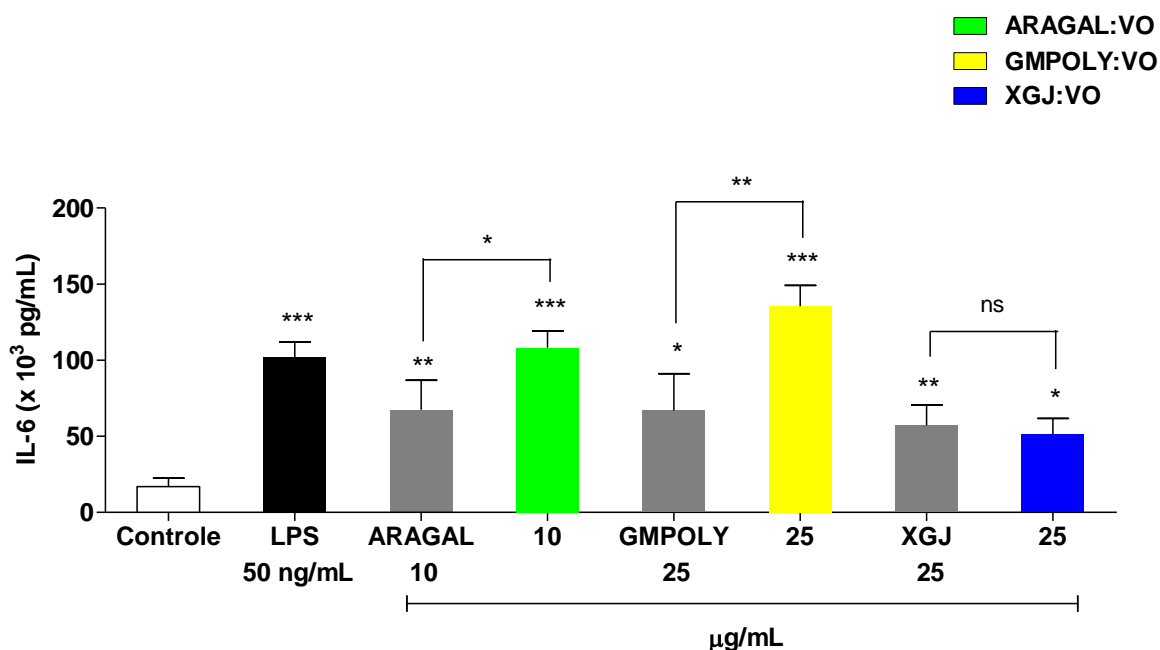


FIGURA 24. PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-6 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ARAGAL, ARAGAL:VO, GMPOLY, GMPOLY:VO, XGJ E XGJ:VO POR 48 HORAS

Nota: Resultados obtidos para produção de IL-6 por macrófagos peritoneais de camundongos sob efeito de ARAGAL 10 µg/mL, ARAGAL:VO 10 µg/mL, GMPOLY 25 µg/mL, GMPOLY:VO 25 µg/mL, XGJ 25 µg/mL e XGJ:VO 25 µg/mL. Após 48 horas na presença dos polímeros a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>, utilizou-se 100 µL do meio de reação para a quantificação de IL-6 por ELISA, segundo as especificações do fabricante. Como controle positivo para a produção de IL-6 utilizou-se LPS (50 ng/mL). Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 3, sendo cada experimento em triplicata). \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 e ns = não significativo.

As galactomananas de *Mimosa scabrella* apresentaram perfis diferentes em relação a produção de IL-6. Os resultados de tais avaliações estão representados na figura 25. GALMAN-A na concentração de 25 µg/mL não alterou significativamente a produção de IL-6, enquanto que GALMAN-A:VO na mesma concentração aumentou a produção de IL-6 em 452% não havendo diferença significativa entre as formas complexada e não complexada de GALMAN-A. Diferentemente de GALMAN-A, GALMAN-B na concentração de 25 µg/mL foi capaz de aumentar significativamente a produção de IL-6 em 492%. Equivalente ao aumento de 634% exercido por GALMAN-B:VO na concentração de 25 µg/mL. Observa-se ainda que GALMAN-B e GALMAN-B:VO aumentaram a produção de IL-6 em 314% e 455%, respectivamente, em relação a GALMAN-A.

Os resultados observados para GALMAN-A e seu complexo indicam que a presença do metal contribuiu para a ativação dos macrófagos em relação à produção de IL-6. Para GALMAN-B os resultados confirmam a hipótese de que a alteração na estrutura causada pela ação de glicosidases pode contribuir de forma efetiva para a ativação de macrófagos, como já observado para a produção de IL-1 $\beta$  (Figura 23).

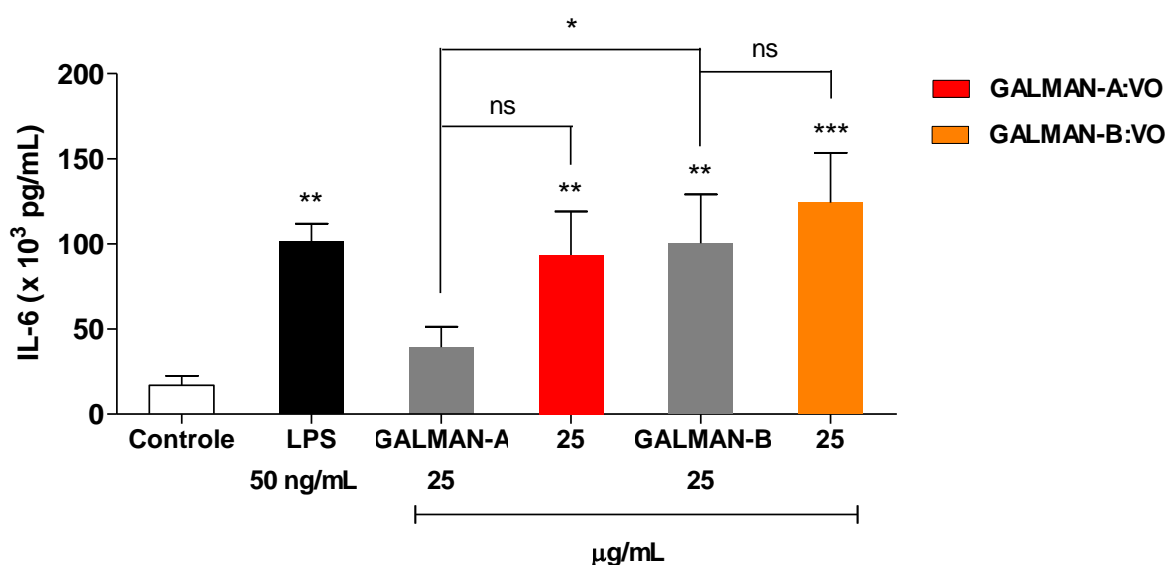


FIGURA 25. PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-6 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM GALMAN-A, GALMAN-A:VO, GALMAN-B E GALMAN-B:VO POR 48 HORAS

Nota: Resultados obtidos para produção de IL-6 por macrófagos peritoneais de camundongos sob efeito de GALMAN-A 25 µg/mL, GALMAN-A:VO 25 µg/mL, GALMAN-B:VO 25 µg/mL e GALMAN-B:VO 25 µg/mL. Após 48 horas na presença dos polímeros a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>, utilizou-se 100 µL do meio de reação para a quantificação de IL-6 por ELISA, segundo as especificações do fabricante. Como controle positivo para a produção de IL-6 utilizou-se LPS (50 ng/mL). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP (n = 3, sendo cada experimento em triplicata). \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 e ns = não significativo.

Os efeitos dos polissacarídeos avaliados no presente estudo estão em concordância com alguns dados da literatura. Uma arabinogalactana de “larch wood” e fucoidana da alga marinha *Fucus vesiculosus* aumentaram a produção de IL-6 por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c nas concentrações de 10 µg/mL a 100 µg/mL por 48 horas alcançando um máximo de 33% e 22%, respectivamente (CHOI, 2005). Polissacarídeo extraído de raízes de *Glycyrrhiza uralensis* Fish,

composto por uma cadeia principal de resíduos de D-galactose  $\beta(1\rightarrow3)$ -ligados, aumentou a produção de IL-6 por macrófagos de maneira tempo-dose-dependente. Na dose de 100  $\mu\text{g/mL}$  aumentou em aproximadamente 167%, em relação ao controle, alcançando um máximo de 433% na dose de 400  $\mu\text{g/mL}$  (CHENG, 2008).

#### 6.1.5 Efeitos dos polissacarídeos e seus complexos sobre a produção de TNF- $\alpha$

Os polímeros ARAGAL e ARAGAL:VO 10  $\mu\text{g/mL}$  e GMPOLY e GMPOLY:VO 25  $\mu\text{g/mL}$  não alteraram a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais tratados por 48 horas, em relação ao controle (Figura 26).

No presente estudo, o tratamento de macrófagos peritoneais de camundongos com XGJ na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  por 48 horas não alterou a produção de TNF- $\alpha$ , assim como XGJ:VO na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 26). XGJ foi avaliada anteriormente quanto à produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais tratados por 24 horas observando-se um aumento de 27% e 58% nas concentrações de 25  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, em relação ao controle (ROSÁRIO, 2011). Como observado para a produção de IL-6 (Figura 24), esperava-se que a produção de TNF- $\alpha$  em 48 horas de tratamento também fosse maior em relação a observada por Rosário e colaboradores (2011). Entretanto, isto não ocorreu. Foi observado que a produção de TNF- $\alpha$  em 48 horas alcançou um platô, não havendo diferença significativa entre a produção TNF- $\alpha$  pelos macrófagos tratados apenas com meio de culturas e o controle positivo (macrófagos tratados com 50 ng/mL de LPS).

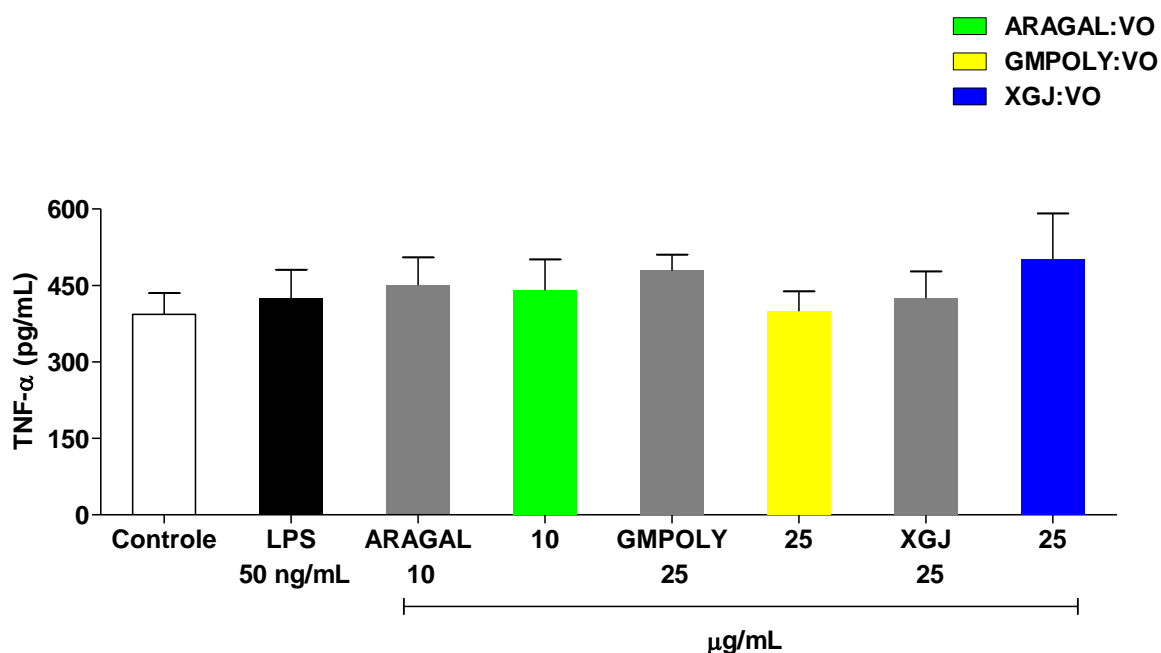


FIGURA 26. PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$  POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ARAGAL, ARAGAL:VO, GMPOLY, GMPOLY:VO, XGJ E XGJ:VO POR 48 HORAS

Nota: Resultados obtidos para produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais de camundongos sob efeito de ARAGAL 10  $\mu\text{g/mL}$ , ARAGAL:VO 10  $\mu\text{g/mL}$ , GMPOLY 25  $\mu\text{g/mL}$ , GMPOLY:VO 25  $\mu\text{g/mL}$ , XGJ 25  $\mu\text{g/mL}$  e XGJ:VO 25  $\mu\text{g/mL}$ . Após 48 horas na presença dos polímeros a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>, utilizou-se 100  $\mu\text{L}$  do meio de reação para a quantificação de TNF- $\alpha$  por ELISA, segundo as especificações do fabricante. Como controle positivo para a produção de TNF- $\alpha$  utilizou-se LPS (50 ng/mL). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP ( $n = 3$ , sendo cada experimento em triplicata).

Resultado semelhante foi obtido para os polímeros GALMAN-A, GALMAN-A:VO, GALMAN-B e GALMAN-B:VO na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ , os quais não alteraram significativamente a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais tratados por 48 horas, em relação ao controle (Figura 27).

O TNF- $\alpha$  é capaz de induzir uma ampla variedade de atividades, como o aumento na produção de prostaglandina E2 (PGE2). A concentração de PGE2 aumentada regula a atividade de TNF- $\alpha$  por diminuir a expressão gênica de TNF- $\alpha$  fazendo com que a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos alcance um platô (KUNKEL, 1988). Outro estudo demonstra que macrófagos da linhagem RAW264.7 tratados com lectina tipo-C apresenta platô na produção de TNF- $\alpha$  em 9 horas de tratamento e a produção de fator estimulante de colônia-granulócito (G-CSF) aumenta até 24

horas, sugerindo que cada citocina é secretada com uma cinética diferente (YAMANISHI, 2007). Dessa forma, para uma melhor avaliação dos efeitos na produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos tratados com os polímeros estudados no presente trabalho faz-se necessário tempo menor de tratamento, como 6, 12 e 24 horas.

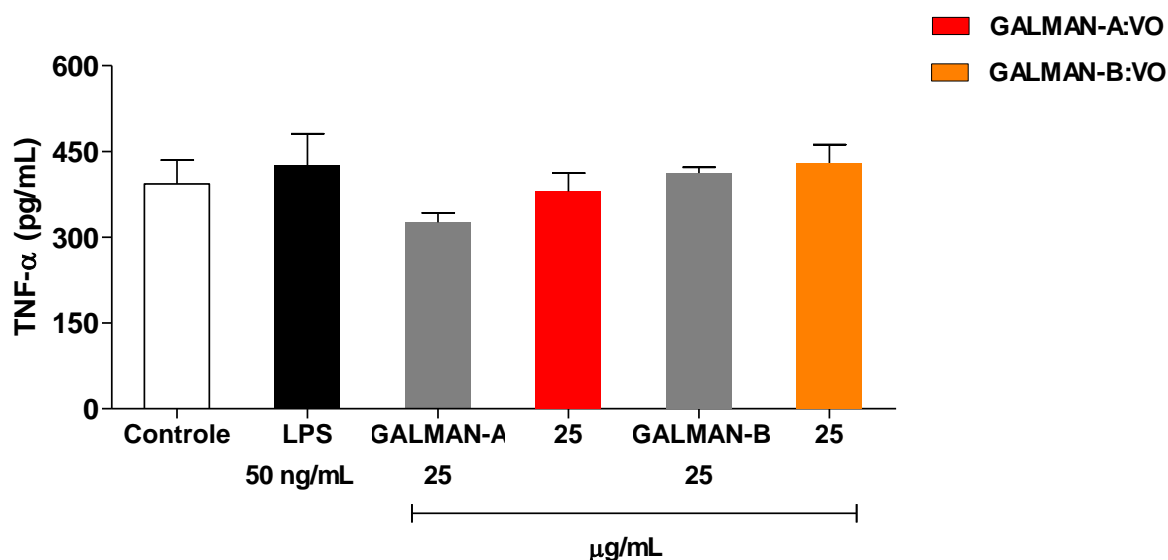


FIGURA 27. PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$  POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM GALMAN-A, GALMAN-B, GALMAN-A:VO E GALMAN-B:VO POR 48 HORAS

Nota: Resultados obtidos para produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais de camundongos sob efeito de GALMAN-A 25  $\mu$ g/mL, GALMAN-A:VO 25  $\mu$ g/mL, GALMAN-B 25  $\mu$ g/mL e GALMAN-B:VO 25  $\mu$ g/mL. Após 48 horas na presença dos polímeros a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>, utilizou-se 100  $\mu$ L do meio de reação para a quantificação de TNF- $\alpha$  por ELISA, segundo as especificações do fabricante. Como controle positivo para a produção de TNF- $\alpha$  utilizou-se LPS (50 ng/mL). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP (n = 3, sendo cada experimento em triplicata).

Diferentes efeitos foram observados para outras classes de polissacarídeos em relação à produção de TNF- $\alpha$ . Uma arabinogalactana de “larch wood” e fucoidana da alga marinha *Fucus vesiculosus* aumentaram a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c nas concentrações de 10  $\mu$ g/mL a 100  $\mu$ g/mL por 48 horas alcançando um máximo de aproximadamente 36% e 9%, respectivamente (CHOI, 2005). Em outro estudo foi observado tanto aumento quanto redução na produção de TNF- $\alpha$ . A partir de polissacarídeos extraídos de sementes

de *Leucaena leucocephala* foram preparados dois derivados, um C-glicosídico 2-propanol (PE) e outro sulfatado (SPE). Após 24 horas de tratamento com PE e SPE na concentração de 10 µg/mL de macrófagos RAW-264.7 estimulados com LPS, PE reduziu a produção de TNF-α em 39,1%, enquanto que SPE aumentou a concentração de TNF-α em 146,25% (GAMAL-ELDEEN, 2007).

#### 6.1.6 Efeitos dos polissacarídeos e seus complexos sobre a produção de interleucina-10

IL-10 é uma importante citocina imunorregulatória com múltiplos efeitos biológicos em diferentes tipos celulares. Embora a fonte primária para IL-10 seja linfócitos T regulatórios, monócitos e linfócitos B são as principais fontes de IL-10 em humanos. IL-10 inibe a produção de IL-1β, IL-6, CXCL8 (IL-8), IL-12 e TNF-α por fagócitos mononucleares (COMMINS; STEINKE; BORISH, 2008).

ARAGAL e ARAGAL:VO na concentração de 10 µg/mL não alteraram significativamente a produção de IL-10 por macrófagos tratados por 48 horas, em relação ao controle (Figura 28). Entretanto, uma arabinogalactana de *Juniperus scopulorum* aumentou a produção de IL-10 em aproximadamente 4400%, em relação ao controle, por macrófagos J774.A1 tratados por 24 horas com 200 µg/mL do polissacarídeo (SCHEPETKIN, 2005). Essa diferença observada quanto a produção de IL-10 pela arabinogalactana (ARAGAL) de *Anadenanthera colubrina* (angico branco) e pela arabinogalactana de *Juniperus scopulorum* pode ser devido a características estruturais desses polissacarídeos, como massa molecular e conformação espacial, ou estar relacionada com a linhagem celular tratada (no presente trabalho foi utilizado cultura primária de macrófagos peritoneais, enquanto que naquele trabalho utilizou-se a linhagem de macrófagos J774.A1).

Embora haja uma tendência de aumento na produção de IL-10 por macrófagos tratados com a galactomanana GMPOLY na concentração de 25 µg/mL não houve aumento significativo. GMPOLY:VO na mesma concentração também não alterou a produção de IL-10, em relação ao controle (Figura 28). Assim como as formas complexada e não complexada de ARAGAL e GMPOLY, XGJ e XGJ:VO na concentração de 25 µg/mL não alteraram significativamente a produção de IL-10 por macrófagos peritoneais de camundongos (Figura 28).



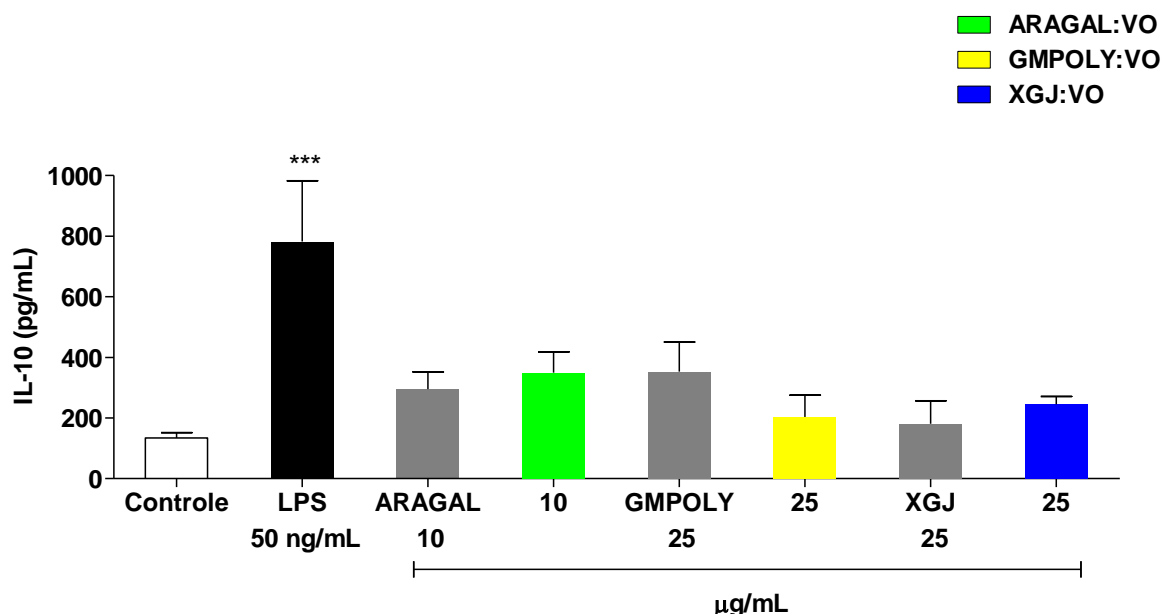


FIGURA 28. PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-10 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ARAGAL, ARAGAL:VO, GMPOLY, GMPOLY:VO, XGJ E XGJ:VO POR 48 HORAS

Nota: Resultados obtidos para produção de IL-10 por macrófagos peritoneais de camundongos sob efeito de ARAGAL 10 µg/mL, ARAGAL:VO 10 µg/mL, GMPOLY 25 µg/mL, GMPOLY:VO 25 µg/mL, XGJ 25 µg/mL e XGJ:VO 25 µg/mL. Após 48 horas na presença dos polímeros a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>, utilizou-se 100 µL do meio de reação para a quantificação de IL-10 por ELISA, segundo as especificações do fabricante. Como controle positivo para a produção de IL-10 utilizou-se LPS (50 ng/mL). Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 3, sendo cada experimento em triplicata). \*\*\* P < 0,001 em comparação com o controle.

Embora GALMAN-A e GALMAN-A:VO na concentração de 25 µg/mL não tenham alterado significativamente a produção de IL-10, GALMAN-B e GALMAN-B:VO na mesma concentração aumentaram a produção de IL-10 em 398% e 367%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 29). Como já observado para as outras interleucinas (IL-1β e IL-6) a modificação na estrutura da galactomanana alterou significativamente a resposta de macrófagos ao tratamento com os dois polímeros. Os resultados de interleucinas obtidos para as galactomanas confirmam a hipótese de que a alteração na estrutura de GALMAN-B, em relação a GALMAN-A, pode ter resultado em uma estrutura contendo repetições denominadas padrões moleculares associado a patógenos (PAMPs). Essas estruturas conservadas podem

ser reconhecidas especificamente por receptores na superfície de macrófagos iniciando respostas inflamatórias e imunológicas contra patógenos (SILVA, 2009).

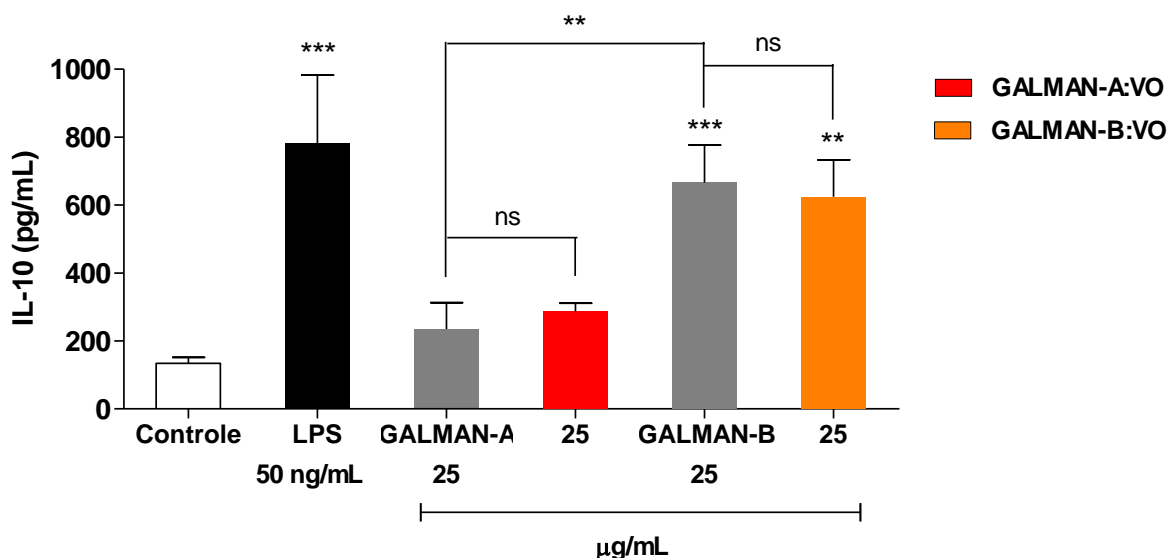


FIGURA 29. PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-10 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM GALMAN-A, GALMAN-B, GALMAN-A:VO E GALMAN-B:VO POR 48 HORAS

Nota: Resultados obtidos para produção de IL-10 por macrófagos peritoneais de camundongos sob efeito de GALMAN-A 25 µg/mL, GALMAN-A:VO 25 µg/mL, GALMAN-B 25 µg/mL e GALMAN-B:VO 25 µg/mL. Após 48 horas na presença dos polímeros a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>, utilizou-se 100 µL do meio de reação para a quantificação de IL-10 por ELISA, segundo as especificações do fabricante. Como controle positivo para a produção de IL-10 utilizou-se LPS (50 ng/mL). Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 3, sendo cada experimento em triplicata). \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 e ns = não significativo.

## 6.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS POLISSACARÍDEOS E SEUS COMPLEXOS SOBRE A FORMA AMASTIGOTA INTRACELULAR DE *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*

Após a avaliação dos efeitos dos polímeros sobre a produção de NO e das citocinas acima mencionadas, foi avaliada a atividade leishmanicida, sobre a forma amastigota intracelular de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*.

Para caracterizar a atividade leishmanicida para os compostos em estudo, os macrófagos infectados (controle) e os macrófagos infectados e tratados, foram raspados e transferidos para o meio de Tobbie & Evans. Nesta condição, apenas os

parasitas que sobreviveram nos macrófagos infectados e/ou infectados e tratados, irão se desenvolver, como promastigotas no meio de Tobbie & Evans. Os resultados apresentados nas figuras 30, 31, 32 e 33 mostram um exacerbado crescimento de *Leishmania (L.) amazonensis* somente no caso de macrófagos infectados e não tratados. Para macrófagos infectados e tratados com Glucantime<sup>®</sup>, assim como para os tratados com polissacarídeos e seus complexos com oxovanádio, o crescimento de *Leishmania (L.) amazonensis* foi reduzido drasticamente quando comparado com o controle sem tratamento. Este resultado indica que os parasitas intracelulares presentes nos macrófagos infectados e tratados estavam mortos e não foram digeridos antes da interrupção do experimento.

Todos os polissacarídeos na forma livre exibiram efeito leishmanicida contra a forma amastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* em intensidade similar, próximo de 60%, equivalente ao observado para o Glucantime<sup>®</sup> (Figuras 30, 31, 32 e 33). Para as formas complexadas houve discretas diferenças entre as concentrações. ARAGAL (10 µg/mL) reduziu o crescimento da forma promastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* em 61%, enquanto que ARAGAL:VO nas concentrações de 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL reduziu o crescimento em 39%, 48% e 67%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 30).

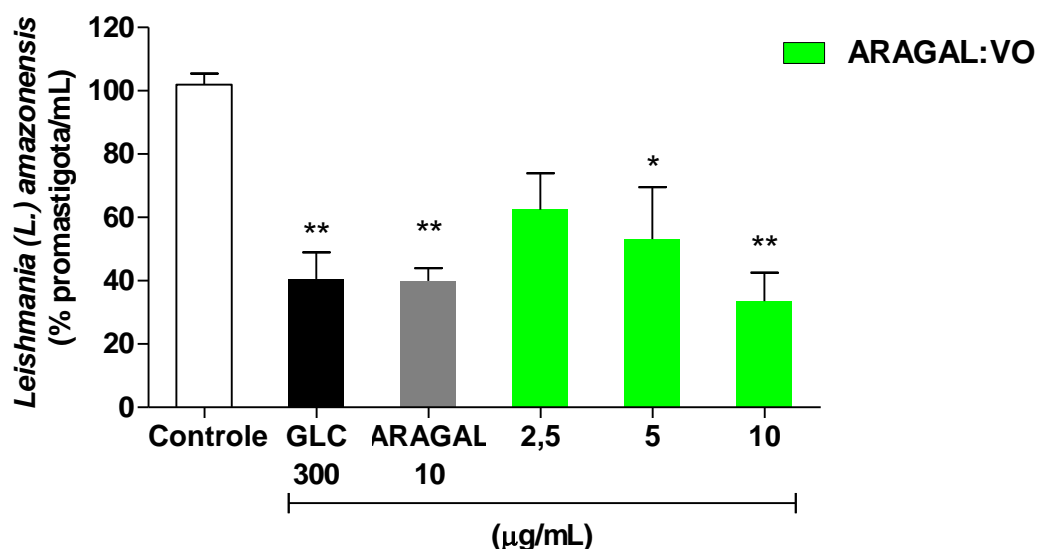


FIGURA 30. ATIVIDADE LEISHMANICIDA SOBRE A FORMA AMASTIGOTA POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ARAGAL E ARAGAL:VO POR 48 HORAS

Nota: Resultados obtidos para a atividade leishmanicida, sobre a forma amastigota intracelular, exercida por macrófagos peritoneais de camundongos sob efeito de ARAGAL e ARAGAL:VO nas concentrações indicadas. Após 2 horas de adesão dos macrófagos, adicionou-se *Leishmania (L.) amazonensis* promastigota na proporção de 5 parasitas por cada macrófago permitindo-se infecção por 12 horas de infecção a 34 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os macrófagos foram tratados com os polímeros durante 48 horas a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tratamento, as células foram raspadas e transferidas para meio Tobbie & Evans incubando-se por 5 a 10 dias a 24-27 °C. O experimento foi avaliado por contagem das formas promastigotas utilizando-se hemocitômetro de Neubauer e o resultado foi expresso em porcentagem de promastigota/mL. Como controle positivo utilizou-se Glucantime® 300 µg/mL (GLC). Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 3, em triplicata). \* P < 0,05 e \*\* P < 0,001.

Na figura 31 observa-se que GMPOLY (25 µg/mL) exibiu atividade equivalente ao polissacarídeo ARAGAL, porém em maior concentração. O complexo GMPOLY:VO alcançou ~72% de efeito na concentração de 10 µg/mL. Em estudos anteriores foi observado para GMPOLY (100 µg/mL) e GMPOLY-VO (1 µg/mL) aproximadamente 98% de inibição do crescimento de *Leishmania (L.) amazonensis* (NOLETO, 2002). No presente trabalho GMPOLY (25 µg/mL) apresentou ~ 58% de atividade leishmanicida, porém em concentração 4 vezes menor. Para GMPOLY:VO o efeito foi menos intenso quando comparado com GMPOLY-VO preparado por Noleto (2002). Esta diferença pode ser atribuída ao processo de preparo dos complexos. Como já descrito, as soluções dos complexos utilizados no presente

estudo foram dialisadas, possibilitando a ausência de metal livre nas preparações dos complexos e, isto pode ter contribuído para menor toxicidade das formas complexadas.

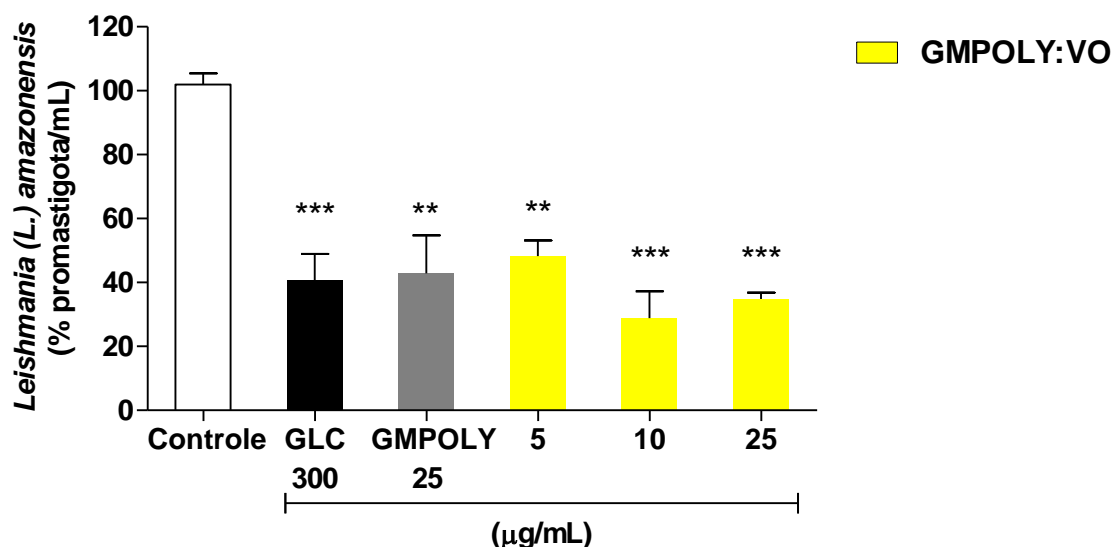


FIGURA 31. ATIVIDADE LEISHMANICIDA SOBRE A FORMA AMASTIGOTA POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM GMPOLY E GMPOLY:VO POR 48 HORAS

Nota: Resultados obtidos para a atividade leishmanicida, sobre a forma amastigota intracelular, exercida por macrófagos peritoneais de camundongos sob efeito de GMPOLY e GMPOLY:VO nas concentrações indicadas. Após 2 horas de adesão dos macrófagos, adicionou-se *Leishmania (L.) amazonensis* promastigota na proporção de 5 parasitas por cada macrófago permitindo-se infecção por 12 horas de infecção a 34 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os macrófagos foram tratados com os polímeros durante 48 horas a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tratamento, as células foram raspadas e transferidas para meio Tobbie & Evans incubando-se por 5 a 10 dias a 24-27 °C. O experimento foi avaliado por contagem das formas promastigotas utilizando-se hemocitômetro de Neubauer e o resultado foi expresso em porcentagem de promastigota/mL. Como controle positivo utilizou-se Glucantime® 300 µg/mL (GLC). Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 3, em triplicata). \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001.

A xiloglucana XGJ e seu complexo XGJ:VO exibiram comportamento similar a GMPOLY e GMPOLY:VO, como pode ser observado na figura 32. XGJ (25 µg/mL) reduziu o crescimento da forma promastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* em 59%, enquanto que XGJ:VO nas concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL reduziu o crescimento em 63% e 58%, respectivamente, em relação ao controle.

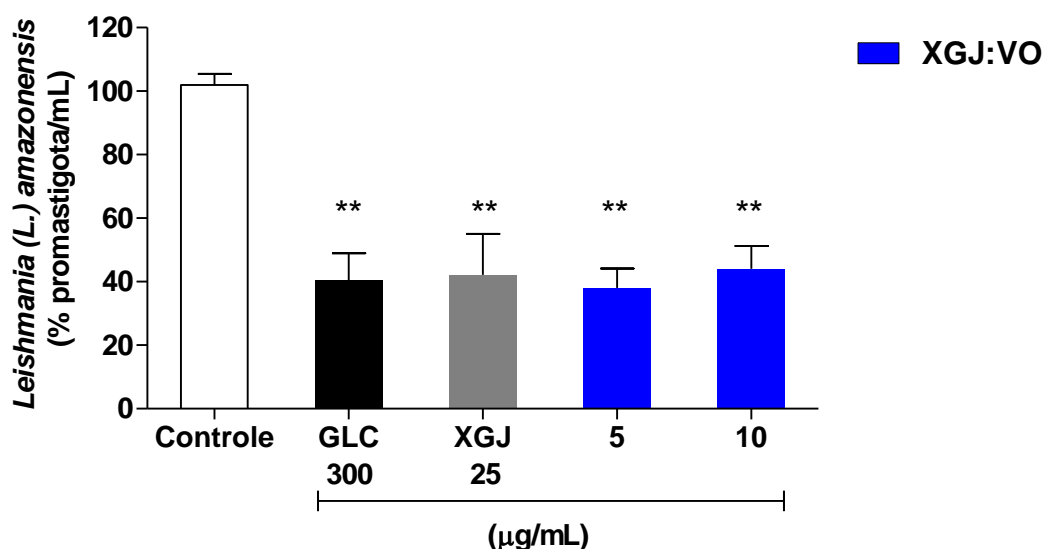


FIGURA 32. ATIVIDADE LEISHMANICIDA SOBRE A FORMA AMASTIGOTA POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM XGJ E XGJ:VO POR 48 HORAS

Nota: Resultados obtidos para a atividade leishmanicida, sobre a forma amastigota intracelular, exercida por macrófagos peritoneais de camundongos sob efeito de XGJ e XGJ:VO nas concentrações indicadas. Após 2 horas de adesão dos macrófagos, adicionou-se *Leishmania (L.) amazonensis* promastigota na proporção de 5 parasitas por cada macrófago permitindo-se infecção por 12 horas de infecção a 34 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os macrófagos foram tratados com os polímeros durante 48 horas a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tratamento, as células foram raspadas e transferidas para meio Tobbie & Evans incubando-se por 5 a 10 dias a 24-27 °C. O experimento foi avaliado por contagem das formas promastigotas utilizando-se hemocitômetro de Neubauer e o resultado foi expresso em porcentagem de promastigota/mL. Como controle positivo utilizou-se Glucantime® 300 µg/mL (GLC). Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 3, em triplicata). \*\* P < 0,01.

Os efeitos das galactomananas GALMAN-A e GALMAN-B sobre o crescimento de *Leishmania (L.) amazonensis* estão apresentados na figura 33. GALMAN-A (100 µg/mL) reduziu o crescimento do protozoário em 60%. O complexo GALMAN-A:VO na concentração de 25 µg/mL reduziu o crescimento da forma promastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* em ~68%. GALMAN-B na concentração de 100 µg/mL reduziu o crescimento da forma promastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* em aproximadamente 67% similar ao observado para os outros polímeros na forma livre, GALMAN-A (100 µg/mL) e em concentrações dez vezes menor para ARAGAL e quatro vezes menor para GMPOLY e XGJ. O complexo GALMAN-B:VO reduziu em 65% o crescimento do protozoário na

concentração de 10 µg/mL. Este complexo também mostrou ser mais potente que GALMAN-A:VO, pois GALMAN-B:VO exerceu seus efeitos a partir da concentração de 5 µg/mL enquanto que GALMAN-A:VO reduziu o crescimento de *Leishmania (L.) amazonensis* apenas na concentração de 25 µg/mL.

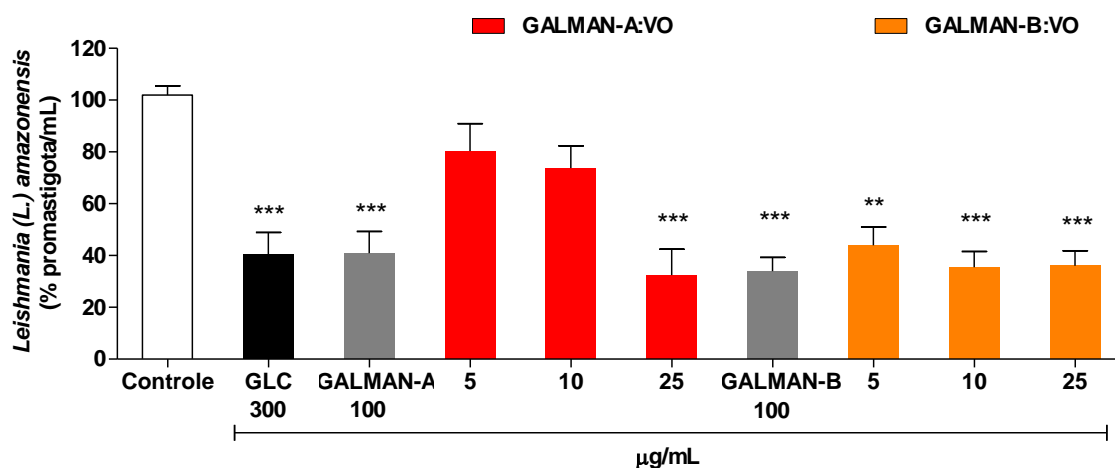


FIGURA 33. ATIVIDADE LEISHMANICIDA SOBRE A FORMA AMASTIGOTA POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM GALMAN-A, GALMAN-A:VO, GALMAN-B E GALMAN-B:VO POR 48 HORAS

Nota: Resultados obtidos para a atividade leishmanicida, sobre a forma amastigota intracelular, exercida por macrófagos peritoneais de camundongos sob efeito de GALMAN-A, GALMAN-A:VO, GALMAN-B, GALMAN-B:VO nas concentrações indicadas. Após 2 horas de adesão dos macrófagos, adicionou-se *Leishmania (L.) amazonensis* promastigota na proporção de 5 parasitas por cada macrófago permitindo-se infecção por 12 horas de infecção a 34 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os macrófagos foram tratados com os polímeros durante 48 horas a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tratamento, as células foram raspadas e transferidas para meio Tobbie & Evans incubando-se por 5 a 10 dias a 24-27 °C. O experimento foi avaliado por contagem das formas promastigotas utilizando-se hemocitômetro de Neubauer e o resultado foi expresso em porcentagem de promastigota/mL. Como controle positivo utilizou-se Glucantime<sup>®</sup> 300 µg/mL (GLC). Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 3, cada um em triplicata). \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001.

Os polissacarídeos obtidos de muitas fontes naturais representam uma classe de macromoléculas de grande diversidade estrutural. Os polímeros utilizados neste trabalho, arabinogalactana (ARAGAL) de *Anadenanthera colubrina* (angico branco), galactomanana (GMPOLY) do líquen *Ramalina celastri*, duas preparações de galactomananas (GALMAN-A e GALMAN-B) de sementes de *Mimosa scabrella* (bracatinga) e xiloglucana obtida de sementes de *Hymenaea courbaril* (jatobá), representam a versatilidade destas macromoléculas e o seu grande potencial de

aplicação. Além dos polímeros nativos, vários estudos têm sido realizados com polissacarídeos modificados quimicamente e entre os diversos processos de modificação química utilizados, tem-se dado destaque para a complexação com metais (NOLETO, 2002, 2004; SIBIKINA; IOZEP; MOSKVIN, 2007; NOLETO, 2009; NAVARRO, 2010; MUZARELLI, 2011).

A diversidade estrutural dos polissacarídeos tem sido implicada em uma variabilidade de efeitos biológicos, principalmente na promoção de modulação de respostas celulares, em especial através da ativação de células do sistema imune, como a modificação de funções de macrófagos, células que estão diretamente envolvidas nas respostas antitumoral, antiviral e antibacteriana (BOHN; BeMILLER, 1995; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Nestes efeitos, tem merecido destaque as beta- e alfa-glucanas, mananas, acemanana, galactomananas, arabinogalactanas, polissacarídeos sulfatados natural ou quimicamente e xiloglucanas (BOHN; BeMILLER, 1995; STUELP-CAMPELO, 2002; RAMESH; YAMAKI; TSUHIDA, 2002; LEUNG, 2004; MELLINGER, 2005, 2008; AKRAMIENE, 2007).

As respostas de macrófagos a estas moléculas podem ser observadas através de interferência na produção de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), óxido nítrico (NO), síntese e liberação de citocinas, capacidade fagocítica, entre outras. Os polissacarídeos utilizados no presente estudo já foram anteriormente caracterizados como modificadores da resposta biológica, através da ativação de algumas funções de macrófagos, em especial a produção de  $O_2^{\bullet-}$ , NO e alteração da atividade fagocítica (NOLETO, 2002; MORETÃO, 2003, 2004; ROSÁRIO, 2008, 2010; KANGUSSU-MARCOLINO, 2010, SILVEIRA, 2010).

Adicionalmente, para o polissacarídeo GMPOLY e seu complexo com vanádio já havia sido caracterizada a atividade leishmanicida (NOLETO, 2002), porém não foram avaliados quanto à produção de citocinas. No presente estudo, os polissacarídeos nas formas nativas e complexadas com oxovanádio (IV/V) foram testados para ativação de outras funções de macrófagos, como a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias e atividade leishmanicida, visando contribuir para o entendimento do mecanismo de ação destas moléculas, além de descobrir novos compostos com atividade leishmanicida. O estudo mostrou que a complexação dos polímeros afetou drasticamente a viabilidade celular de macrófagos (Figura 20). A complexação pode promover uma alteração conformacional no polissacarídeo nativo



permitindo a utilização das moléculas em baixas concentrações. Tal efeito pode também ser decorrente da presença do metal e, não exatamente de uma alteração na estrutura do polímero, desde que a ocorrência de citotoxicidade tem sido descrita para diferentes compostos de vanádio (MUKHERJEE, 2004; MOLINUEVO; ETCHEVERRY; CORTIZO, 2005).

A produção ânion superóxido, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  por macrófagos, estão diretamente envolvidas na ação microbida e citotóxica exercida por estas células (GORDON; TAYLOR, 2005; MOSSER; EDWARDS, 2008). A ativação de macrófagos por polissacarídeos para a produção destas citocinas tem sido descrita (CHOI, 2005; CHENG, 2008; GAMAL-ELDEEN, 2007), porém não há dados sobre o efeito de complexos de polissacarídeos sobre a produção destes mediadores.

No presente estudo todos os polissacarídeos e seus complexos estimularam a produção de IL-1 $\beta$ , quando comparado aos macrófagos não tratados, porém somente GMPOLY apresentou diferença entre a forma nativa e a complexada, como evidenciado pelo aumento de aproximadamente 2 vezes na produção desta interleucina nos macrófagos tratados com GMPOLY:VO em relação a GMPOLY na mesma concentração (Figura 22). O tratamento de macrófagos com as preparações de galactomanas (GALMAN-A e GALMAN-B) promoveu um aumento de 2 vezes na produção de IL-1 $\beta$  na presença de GALMAN-B em comparação com GALMAN-A. Este resultado contribui para a afirmação de que a ativação de macrófagos pode estar relacionada com as características estruturais, pois GALMAN-A é a estrutura nativa enquanto que GALMAN-B é o mesmo polímero na forma parcialmente degradada. Para interleucina-6 os polissacarídeos ARAGAL e GMPOLY também exibiram diferença na produção dessa citocina entre as formas nativas e complexadas. Ambos os complexos promoveram um aumento de ~ 2 vezes nos níveis de IL-6 em relação as respectivas formas não complexadas (Figura 24). Para GALMAN-A e GALMAN-B houve estímulo, porém não ocorreram diferenças entre a forma livre e os complexos (Figura 25). Não foi possível observar se os polissacarídeos e seus complexos ativaram os macrófagos para a produção de TNF- $\alpha$  devido à ocorrência de platô (KUNKEL, 1988; YAMANISHI, 2007), tornando

necessária a avaliação dessa citocina em um menor período de tempo de tratamento (Figuras 26 e 27).

A produção de interleucinas anti-inflamatórias por macrófagos tratados com polissacarídeos também tem sido avaliada (SCHEPETKIN, 2005). No presente estudo, somente GALMAN-B e seu complexo com oxovanádio estimularam a produção de IL-10 por macrófagos tratados com estas moléculas (Figura 29).

Todos os polissacarídeos e seus complexos de um modo geral, embora em intensidades diferentes, estimularam macrófagos para a produção de mediadores envolvidos nos processos microbicidas e inflamatórios. Quanto à atividade leishmanicida todos os polissacarídeos, assim como seus complexos, promoveram uma redução no crescimento de *Leishmania (L.) amazonensis*, porém não apresentaram diferença significativa entre as formas nativas e complexadas para os polímeros ARAGAL, GMPOLY, XGJ, GALMAN-A e GALMAN-B (Figuras 30, 31, 32 e 33). O intenso efeito leishmanicida observado pode ser, em parte, devido a intensa produção das interleucinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) por estas moléculas. Como já descrito, estes mediadores estão envolvidos nos processos inflamatórios e microbicidas.

A atividade leishmanicida é atribuída também à produção de óxido nítrico, como observado por Matte e colaboradores (2000) que demonstraram que compostos de vanádio como o bisperoxovanádio 1,10-fenantrolina (bpV(phen)) e bisperoxo (piconolato) oxovanadato (V) (bpV(pic)), injetados via intraperitoneal na concentração de 2,5  $\mu$ mol/30 g de peso corporal em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major* e *Leishmania donovani* controlaram a progressão das leishmanioses de maneira similar pela modulação da atividade microbicida dependente de NO. Em outro estudo, GMPOLY na concentração de 100  $\mu$ g/mL e GMPOLY-VO (0,5-1,0  $\mu$ g/mL) exerceram atividade leishmanicida sobre a forma amastigota de *Leishmania amazonensis* evidenciada pela redução de 93% do crescimento deste parasita (NOLETO, 2002). Naquele estudo GMPOLY promoveu um aumento de ~40% na produção de NO, porém o seu complexo não interferiu nesta via. Desta forma, os autores sugeriram que a atividade leishmanicida de GMPOLY e GMPOLY-VO poderia ser consequência da ativação da via de NO e do envolvimento do vanádio, respectivamente.

No presente estudo o efeito leishmanicida para GMPOLY e seu complexo foi confirmado e a produção de altos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6 pelos macrófagos tratados

com estas moléculas certamente contribuíram para este efeito. O polímero XGJ também promoveu aumento da produção de óxido nítrico por macrófagos (ROSÁRIO, 2008), porém o complexo XGJ:VO não ativou esta via (Figura 21) sugerindo que a complexação de XGJ com oxovanádio (IV/V) pode diminuir a capacidade de XGJ de estimular a produção de NO por macrófagos. Tanto ARAGAL como seu complexo não ativaram esta via, sugerindo que o efeito leishmanicida observado deve ser decorrente da produção de IL-1 $\beta$  e IL-6. Uma importante observação pode ser destacada, GALMAN-B e seu complexo promoveram o mais efeito leishmanicida (Figura 33), o que está em concordância com os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e IL-6). Por outro lado, foi o único polissacarídeo dos avaliados que ativou macrófagos para a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 29). Estudos têm demonstrado que a produção de IL-10 *in vivo* pode estar relacionada com a proteção da *Leishmania*, pois é um dos mecanismos propostos que o parasita utiliza para escapar da resposta imunológica e sobreviver no hospedeiro (REITHINGER, 2007). Entretanto, se esse aumento na produção de IL-10 for menor que o aumento na produção de INF- $\gamma$  o organismo torna-se capaz de controlar a progressão da leishmaniose, como demonstrado por Haldar e colaboradores (2009). Esses pesquisadores utilizaram uma combinação de doses sub-ótimas de gluconato antimônio de sódio (SAG), 50 mg SAG/kg de peso corporal, e de diperoxovanadato, 0,5  $\mu$ mol/kg de peso corporal, determinando-se ser eficaz no combate à infecção experimental de camundongos BALB/c com *Leishmania donovani* resistente a antimônio, evidenciada pela redução significativa da carga parasitária no fígado e no baço de 77% e 79%, respectivamente, onde SAG é essencialmente ineficaz.

Além dos mecanismos dependente de NO e INF- $\gamma$  para a atividade leishmanicida, tem sido proposto que essa atividade pode ser causada por intercalação de compostos de vanádio no DNA de *Leishmania*. Dois compostos de vanádio (V), [VO(2-hidroxibenzaldeído semicarbazone-2H)(phen)] e [VO(2-hidróxi-3-metoxibenzaldeído semicarbazone-2H)(phen)], apresentaram IC<sub>50</sub> de 2,74  $\mu$ M e 2,75  $\mu$ M, respectivamente, sobre a forma promastigota de *Leishmania panamensis* e IC<sub>50</sub> de 19,52  $\mu$ M e 20,75  $\mu$ M, respectivamente, sobre a forma amastigota de *Leishmania panamensis* (BENÍTEZ, 2011).

No aspecto biológico, os resultados deste trabalho confirmaram que os polissacarídeos na forma nativa são moduladores de várias funções de macrófagos e mostraram que a complexação potencializou estas moléculas para alguns dos parâmetros avaliados, em especial a atividade leishmanicida. Os estudos aqui apresentados, embora não tenham identificado alvos moleculares específicos envolvidos no mecanismo de ação dos polímeros, sugerem pistas, como ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B e da proteína tirosina fosfatase SHP-1.

SHP-1 é uma proteína tirosina fosfatase que, quando ativada, inibe a fosforilação de Jak e STAT1, mediadores intracelulares necessários para a indução de genes inflamatórios e imunológicos em resposta a ação de citocinas pró-inflamatórias. *Leishmania* ativa SHP-1 de forma a possibilitar sua sobrevivência no ambiente intracelular (SACKS; SHER, 2002). Dessa forma, os polissacarídeos e seus complexos podem atuar inativando SHP-1, estimulando a sinalização por STAT1, e/ou podem ativar NF- $\kappa$ B de modo a favorecer o controle da infecção.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que, de forma geral os polissacarídeos e seus complexos com polissacarídeos-oxovanádio (IV/V) interferem nas funções de macrófagos *in vitro*. Os efeitos foram evidenciados por:

1. Alta citotoxicidade dos complexos, o que permitiu utilizar concentrações de até 10 µg/mL para ARAGAL:VO e de até 25 µg/mL para os demais complexos;
2. Os complexos ARAGAL:VO, GMPOLY:VO e XGJ:VO não interferiram na produção de NO em 48 horas de tratamento;
3. Todos os polímeros nativos e seus complexos estimularam a produção de IL-1 $\beta$  em relação ao controle (células sem tratamento), porém somente o tratamento com GMPOLY:VO promoveu aumento nos níveis desta interleucina quando comparado com o respectivo polímero não complexado. Para os demais polissacarídeos não houve diferença entre as formas nativas e complexadas, indicando que a complexação com oxovanádio não altera a atividade de ARAGAL, XGJ, GALMAN-A e GALMAN-B em relação à produção IL-1 $\beta$ ;
4. Os níveis de IL-6 aumentaram significativamente em todos os tratamentos com os polímeros e seus complexos com oxovanádio. Para os complexos ARAGAL:VO e GMPOLY:VO houve aumento significativo em relação aos respectivos polímeros não complexados, indicando que a complexação com oxovanádio altera a atividade destes polissacarídeos em relação à produção IL-6. Para XGJ:VO, GALMAN-A:VO e GALMAN-B:VO a complexação não interferiu na resposta para esta interleucina quando comparado com a forma não complexada;

5. Em relação à produção e secreção da interleucina-10, apenas GALMAN-B e seu complexo GALMAN-B:VO aumentaram significativamente os níveis desta citocina;
6. Em 48 horas de tratamento a produção de TNF- $\alpha$  alcançou um platô não sendo possível determinar os efeitos dos polissacarídeos nativos e seus complexos nessa via, sendo necessária a avaliação da produção de TNF- $\alpha$  em menor período de tempo de tratamento com os polímeros;
7. Todos os polissacarídeos e seus complexos com oxovanádio exibiram atividade leishmanicida em intensidade equivalente a observada para o Glucantime<sup>®</sup>.

## REFÊRENCIAS

ADRIAZOLA, I. O. *Avaliação dos efeitos da galactomanana isolada de Mimosa scabrella e seus complexos com oxovanádio (IV/V) sobre macrófagos peritoneais de camundongos*. Trabalho de Iniciação Científica em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

AKRAMIENE, D.; KONDROTAS, A.; DIDZIAPETRIENE, J.; KEVELAITIS, E. Apzvalginis Straipsnis: Effects of  $\beta$ -glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*, v. 43, p. 587-606, 2007.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, v. 357, p. 593-615, 2001.

ALEXEEV, Y. E.; VASILCHENKO, I. S.; KHARISOV, B. I.; BLANCO, L. M.; GARNOVSKII, A. D.; ZHDANOV, Y. A. Review: synthetically modified carbohydrates as ligands. *Journal of Coordination Chemistry*, v. 57, p. 1447-1517, 2004.

AMEEN, M. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: emerging therapies and progress in disease management. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 11, p. 557-569, 2010.

ASSOIAN, R. K. AND KLEIN, E. A. Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends in Cell Biology*, v. 18, p. 347-352, 2008.

BALANÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology*, v. 30, p. 435-443, 1998.

BAUD, V. AND KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology*, v. 11, p. 372-377, 2001.

BENÍTEZ, J.; BECCO, L.; CORREIA, I.; LEAL, S. M.; GUISET, H.; PESSOA, J. C.; LORENZO, J.; TANCO, S.; ESCOBAR, P.; MORENO, V.; GARAT, B.; GAMBINO, B. Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: new achievements. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 105, p. 303-312, 2011.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, v. 2, p. 907-916, 2001.

BOHN, J. A. AND BeMILLER, J. N. (1→3)β-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, v. 28, p. 3-14, 1995.

CHADWICK, W.; MAGNUS, T.; MARTIN, B.; KESELMAN, A.; MATTSON, M. P.; MAUDSLEY, S. Targeting TNF-α receptors for neurotherapeutics. *Trends in Neurosciences*, v. 31, p. 504-511, 2008.

CHANG, K. P.; NACY, C. A.; PEARSON, R. D. Intracellular parasitism of macrophages in leishmaniasis: in vitro systems and their applications. *Methods in Enzymology*, v. 132, p. 603-626, 1986.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; SUMAN, R.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, p. 873-882, 2007.

CHENG, A.; WAN, F.; WANG, J.; JIN, Z.; XU, X. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. *International Immunopharmacology*, v. 8, p. 43-50, 2008.

CHOI, E.; KIM, A.; KIM, Y.; HANG, J. Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan *in vitro*. *Journal Medical Food*, v. 8, p. 446-453, 2005.

COHEN, M. D.; MCMANUS, T. P.; YANG, Z.; QU, Q.; SCHLESINGER, R. B.; ZELIKOFF, J. Vanadium affects macrophages interferon-γ-binding and inducible responses. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 138, p. 110-120, 1996.

COMMINS, S.; STEINKE, J. W.; BORISH, L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 121, p. 1108-1111, 2008.

CORTIZO, A. M.; CAPOROSSO, M.; LETTIERI, G.; ETCHEVERRY, S. B. Vanadate induced nitric oxide production role in osteoblast growth and differentiation. *European Journal of Pharmacology*, v. 400, p. 279-285, 2000.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *The Journal of Immunology*, v. 180, p. 5771-5777, 2008.



CRANS, D. C.; CHEN, H.; ANDERSON, O. P.; MILLER, M. M. Vanadium (V)-protein model studies: solid-state and solution structure. *Journal of the American Chemical Society*, v.115, p. 6769-6776, 1993.

CRANS, D. C. AND SHIN, P. Characterization of vanadium (V) Complexes in aqueous solutions: ethanolamine- and glycine-derived complexes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 116, p. 1305-1315, 1994.

CRANS, D. C.; HOLST, H.; KERAMIDAS, A. D.; REHDER, D. A slow exchanging vanadium (V) peptide complex: vanadium (V)-glycine-tyrosine. *Inorganic Chemistry*, v. 34, p. 2524-2534, 1995.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. L. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, p. 111-126, 2006.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, v. 87, p. 2095–2147, 1996.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review Immunology*, v. 27, p. 519–550, 2009.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 350-356, 1956.

EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, v. 130, p. 432-437, 1959.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, p. 820-832, 2004.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human disease. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 6, p. 232-241, 2010.

GAMAL-ELDEEN, A. M.; AMER, H.; HELMY, W. A.; TALAAT, R. M.; RAGAB, H. Chemically-modified polysaccharide extract derived from *Leucaena leucocephala* alters Raw 264.7 murine macrophage functions. *International Immunopharmacology*, v. 7, p. 871-878, 2007.

GORDON, S. AND TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, p. 953-964, 2005.

GOSH, S. AND HAYDEN, M. S. New regulators of NF- $\kappa$ B in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, p. 837-848, 2008.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}$ N nitrates] in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, p. 131-138, 1982.

HALDAR, K. A.; BANERJEE, S.; NASKAR, K.; KALITA, D.; ISLAM, N. S.; ROY, S. Sub-optimal dose of sodium antimony gluconate (SAG)-diperoxovanadate combinations clears organ parasites from BALB/c mice infected with antimony resistant *Leishmania donovani* by expanding antileishmanial T-cell repertoire and increasing INF- $\gamma$  to IL-10 ratio. *Experimental Parasitology*, v. 122, p. 145-154, 2009.

JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMANN J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of indian visceral leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine*, v. 341, p. 1795-1800, 1999.

KANGUSSU-MARCOLINO, M. M. *Avaliação de Atividade Leishmanicida IN VITRO de Heteropolissacarídeos Ácidos: não Sulfatados e Naturalmente Sulfatados*. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

KEDZIERSKI, L.; SAKTHIANANDESWAREN, A.; CURTIS, J. M.; ANDREWS, P. C.; JUNK, P. C.; KEDZIERSKA, K. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Current Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 599-614, 2009.

KISHIMOTO, T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Research & Therapy*, v. 8, p. 1-6, 2006.

KUNKEL, S. L.; SPENGLER, M.; MAY, M. A.; SPENGLER, R.; LARRICK, J.; REMICK, D. Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 5380-5384, 1988.

LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; ZHU, L. F.; HUI, Y. Z.; YU, B.; FUNG, K. P. Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. *Glycobiology*, v. 14, p. 501-510, 2004.

LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; KOON, J. C. M.; FUNG, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters*, v. 105, p. 101-114, 2006.

LIU, Y.; SHEPERD, E. G.; NELIN, L. D. MAPK phosphatases – regulating the immune response. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, p. 202-212, 2007.

LOWENSTEIN, C. J. AND PADALKO, E. iNOS (NOS2) at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 117, p. 2865-2867, 2004.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, v. 15, p. 323–350, 1997.

MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, p. 1-8, 2009.

MATTE, C.; MARQUIS, J.; BLANCHETE, J.; GROS, P.; FAURE, R.; POSNER, B. I.; OLIVIER, M. Peroxovanadium-mediated protection against murine leishmaniasis: role of the modulation of nitric oxide. *European Journal of Immunology*, v. 30, p. 2555-2564, 2000.

MEDZHITOV, R. AND JANEWAY, C. Innate immunity. *The New England Journal of Medicine*, v. 343, p. 338-334, 2000.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 1, p. 135-145, 2001.

MELLINGER, C. G.; CARBONERO, E. R.; NOLETO, G. R.; CIPRIANI, T. R.; OLIVEIRA, M. B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemical and biological properties of an arabinogalactan from *Phyllanthus niruri*. *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 1479-1483, 2005.

MELLINGER, C. G.; CIPRIANI, T. R.; NOLETO, G. R.; CARBONERO, E. R.; OLIVEIRA, M. B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of *Phyllanthus niruri* after treatment with gastric fluid. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 43, p. 115-120, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2 ed. Brasília, 2007.

MOLINUEVO, M. S.; ETCHEVERRY, S. B.; CORTIZO, A. M. Macrophage activation by a vanadyl–aspirin complex is dependent on L-type calcium channel and the generation of nitric oxide. *Toxicology*, v. 210, p. 205-212, 2005.

MORETÃO, M. P.; BUCHI, F. D.; GORIN, A. J. P.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophages functions. *Immunology Letters*, v. 89, p. 175-185, 2003.

MORETÃO, M. P.; ZAMPRONIO, A. R.; GORIN, A. J. P.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). *Immunology Letters*, v. 93, p. 189-197, 2004.

MOSSER, D. M. AND EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, p. 958-969, 2008.

MUKHERJEE, B.; PATRA, B.; MAHAPATRA, S.; BANERJEE, P.; TIWARI, A.; CHATTERJEE, M. Vanadium-an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters*, v. 150, p. 135-143, 2004.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, v. 366, p. 1561–1577, 2005.

MUZARELLI, R. A. A. Potential of chitin/chitosan-bearing materials for uranium recovery: an interdisciplinary review. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 54-63, 2011.

NAUGLER, W. E. AND KARIN, M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends in Molecular Medicine*, v. 14, p. 109-119, 2008.

NAVARRO, M.; GABBIANI, C.; MESSORI, L.; GAMBINO, D. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. *Drug Discovery Today*, v. 15, p. 1070-1078, 2010.

NOLETO, G. R.; MERCÊ, A. L. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; THOMAZ-SOCCOL, V.; OLIVEIRA, M. B. M. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 233, p.73-82, 2002.

NOLETO, G. R.; MERCÊ, A. L. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; SOCCOL, V. T.; OLIVEIRA, M. B. M. Yeast mannan-vanadium (IV) complexes and their effects on peritoneal macrophages. *Carbohydrate Polymers*, v. 57, p. 113-122, 2004.

NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. O.; MERCÊ, A. L. R.; NOSEDA, M. D.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, S. C.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M. B. M. Two galactomannan preparations from seeds from *Mimosa scabrella* (bracatinga): complexation with oxovanadium(IV/V) and cytotoxicity on HeLa cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 103, p. 749-757, 2009.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*, v. 7, p. 257-266, 2004.

PÉREZ-VICTORIA, J. M.; PÉREZ-VICTORIA, F. J.; PARODI-TALICE, A.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 2468-2474, 2001.

RAMESH, H. P.; YAMAKI, K.; TSUHIDA, T. Effect of fenugreek *Trigonella foenum-graecum* L. galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. *Carbohydrate Polymers*, v. 50, p. 79-83, 2002.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, v. 26, p. 550-555, 2003.

REILLY, T. P.; BELLEVEUE, F. H. III; WORSTER, P. M.; SVESSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. *Biochemical Pharmacology*, v. 55, p. 803-810, 1998.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 7, p. 581-596, 2007.

RITTIG, M.G. AND BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitology Today*, v. 16, p. 292-297, 2000.

ROSÁRIO, M. M. T.; NOLETO, G. R.; BENTO, J. F.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M. B. M.; PETKOWICK, C. L. O. Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. *Phytochemistry*, v. 69, p. 464-472, 2008.

ROSÁRIO, M. M. T.; KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; AMARAL, A. E.; NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. O. Storage xyloglucans: potent macrophages activator. *Chemico-Biological Interactions*, v. 189, p. 127-133, 2011.

SACKS, D. AND NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, p. 845-858, 2002.

SACKS, D. AND SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoan. *Nature Immunology*, v. 3, p. 1041-1047, 2002.

SAKTHIANANDESWAREN, A.; FOOT, S. J.; HANDMAN, E. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, v. 25, p. 383-391, 2009.

SASADA, M.; PABST, M. J.; JOHNSTON, R. B. JR. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 258, p. 9631-9635, 1983.

SCHEPETKIN, I. A.; FAULKNER, C. L.; NELSON-OVERTON, L. K.; WILEY, J. A.; QUINN, M. T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated of *Juniperus scopolorum*. *International Immunopharmacology*, v. 5, p. 1783-1799, 2005.

SCHEPETKIN, I. A. AND QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*, v.6, p.317-333, 2006.

SIBIKINA, O. V.; IOZEP, A. A.; MOSKVIN, A. V. Polysaccharide complexes with metal cations: structure and application (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 43, p. 341-345 2007.

SILVA, C. A.; CHALOUNI, C.; WILLIAMS, A.; HARTL, D.; LEE, C. G.; ELIAS, J. A. Chitin is a size-dependent regulator of macrophage TNF and IL-10 production. *The Journal of Immunology*, v. 182, p. 3573-3582, 2009.

SILVEIRA, J. da C. *Avaliação dos Efeitos Imunomoduladores e Citotóxicos de Polissarídeos de Chorisia speciosa E Hymenaea courbaril*. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SIMS, J. E. AND SMITH, D. R. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, p. 89-102, 2010.

STENVINKEL, P.; KETTELER, M.; JOHNSON, R. J.; LINDHOLM, B.; PECOITS-FILHO, R.; RIELLA, M.; HEIMBÜRGER, O.; CEDERHOLM, T.; GIRNDT, M. IL-10, IL-6, and TNF- $\alpha$ : Central factors in the altered cytokine network of uremia - The good, the bad, and the ugly. *Kidney International*, v. 67, p. 1216–1233, 2005.

STUEHR, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1411, p. 217-230, 1999.

STUELP-CAMPELO, P. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; LEÃO, A. M. A. C.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Effect of a soluble  $\alpha$ -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. *International Immunopharmacology*, v. 2, p. 691-698, 2002.

THOMAS, D. D.; RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; FLORES-SANTANA, W.; SWITZER, C. H.; DONZELLI, S.; HUSSAIN, P.; VECOLI, C.; PAOLOCCI, N.; AMBS, S.; COLTON, C. A.; HARRIS, C. C.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 45, p. 18-31, 2008.

TIDBALL, J. G. AND VILLALTA, A. NO may prompt calcium leakage in dystrophic muscle. *Nature Medicine*, v. 15, p. 243-244, 2009.

TSUJI, A. AND SAKURAI, H. Vanadyl ion suppresses nitric oxide production from peritoneal macrophages of streptozotocin-induced diabetic mice. *Biochemistry and Biophysical Research Communications*, v. 226, p. 506-511, 1996.

VIANNA, G. O. *Anais do 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia*, v. 4, p. 426, 1912.

YAMANISHI, T.; YAMAMOTO, Y.; HATAKEYAMA, T.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. CEL-I, an invertebrate N-acetylgalactosamine-specific C-type lectin, induces TNF- $\alpha$  and G-CSF production by mouse macrophage cell line RAW264.7 cells. *Journal of Biochemistry*, v. 142, p. 587-595, 2007.

YE, J.; DING, M.; LEONARD, S. S.; ROBINSON, V. A.; MILLECCHIA, L.; ZHANG, X.; CASTRANOVA, V.; VALLYATHAN, V.; SHI, X. Vanadate induces apoptosis in epidermal JB6P<sup>+</sup> cells via hydrogen peroxide-mediated reactions. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.202, p. 9-17, 1999a.

YE, J.; DING, M.; ZHANG, X.; ROJANASAKUL, Y.; NEDOSPASOU, S.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V.; SHI, X. Induction of TNF $\alpha$  in macrophages by vanadate is dependent on activation of transcription factor NF- $\kappa$ B and free radical reactions. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 198, p. 193-200, 1999b.



## ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética em Experimentação Animal  
(CEEA)



Nº 431

### CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

### CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


**PROCESSO:** 23075.117869/2009-61

**APROVADO:** 02/03/2010 – R.O. 01/2010

**TÍTULO:** Obtenção de novos compostos com atividade leishmanicida: estudos do mecanismo de ação de polissacarídeos e seus complexos com oxovanádio (IV/V)

**AUTORES:** Guilhermina Rodrigues Noletto, Ana Lucia Ramalho Mercê, Carmem Lúcia O. Petkowick, Monica Mendes K. Marcolino, Alex E. do Amaral

**DEPARTAMENTO:** Bioquímica

  
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio  
Coordenador do CEEA